

БОБЫЛЁВ АЛЕКСАНДР ГЕННАДЬЕВИЧ

**АМИЛОИДНАЯ АГРЕГАЦИЯ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ
СУПЕРСЕМЕЙСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ**

1.5.2. – БИОФИЗИКА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Пушино – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

Научный консультант: Доктор биологических наук
Вихлянцев Иван Милентьевич

Официальные оппоненты:

Гришин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра медицинской и биологической физики имени академика Е.Е. Никольского, профессор.

Огнева Ирина Владимировна, доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, лаборатория биофизики клетки, заведующий.

Кравцова Виолетта Васильевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», кафедра общей физиологии биологического факультета, доцент.

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (г. Москва).

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2026 г. в _____ час. _____ мин. на заседании Диссертационного совета 24.1.232.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290 г. Пущино, Московская область, ул. Институтская, д. 3 и на сайте <https://www.pbcras.ru/>

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Дегтярева Ольга Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Пространственная структура белков имеет важное значение для выполнения ими своей функции и, следовательно, для функционирования живой клетки (Tsytlonok et al., 2013; Tian, Best, 2016). Однако в ряде случаев белки и пептиды утрачивают свою нативную конформацию, что приводит к их неправильному сворачиванию и последующей агрегации. Нарушение сворачивания белков является универсальной проблемой, затрагивающей как фундаментальные аспекты биофизики, так и прикладные области биотехнологии и биомедицины. В частности, белковая агрегация признана одной из ключевых проблем при разработке и промышленном производстве терапевтических белковых препаратов (Singh et al., 2015; Wang, 2015; Ross, Wolfe, 2016).

Помимо технологических аспектов, неправильное сворачивание и агрегация белков ассоциированы с рядом патологических состояний, включая системные амилоидозы, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабет II типа и другие (Dobson, 2003; Knowles et al., 2014). Однако известны и функциональные амилоиды, в частности, таковые найдены у бактерий, у беспозвоночных животных (белок CPEB у *Aplysia*) и млекопитающих (белок Pmel17 в меланосомах) (Fowler et al., 2006; Si et al., 2003). И патологические, и функциональные амилоидные агрегаты имеют специфическую кросс- β структуру, обладают способностью связываться с тирофиавином Т и Конго красным (Sunde et al., 1997; Eisenberg, Jucker, 2012). При этом патологические амилоиды имеют высокую стабильность – устойчивы к ферментативному расщеплению, тогда как функциональные амилоиды способны к дезагрегации. Причины этих различий, по-видимому, скрываются в особенностях структурных изменений, которые происходят при агрегации тех или иных белков. Для выяснения подобных структурных изменений и для более детального фундаментального понимания механизмов белковой агрегации требуется комплексный *in vitro* подход с использованием ряда современных биофизических методов.

Современные представления описывают амилоидогенез как спектр процессов, включающих не только формирование фибрилл, но и менее упорядоченных агрегатов, имеющих частично амилоидные свойства. В этом контексте особый интерес представляют иммуноглобулин-подобные домены (Ig-домены), широко представленные в белках суперсемейства иммуноглобулинов (Williams, Barclay, 1988), к которому относятся и некоторые мышечные белки, в частности, титин и миозин-связывающий белок С (С-белок), являющиеся объектами исследования в данной работе. Эволюционно Ig-домены сформировались как модули для белок-белкового взаимодействия и сборки стабильных надмолекулярных комплексов. Примерами служат иммуноглобулины адаптивного иммунитета, а также некоторые мышечные белки, формирующие основу саркомерного цитоскелета. Благодаря своей универсальной структуре Ig-домены обеспечивают специфическое связывание, но одновременно обладают «липкой» природой, что делает их склонными к агрегации. Однако молекулярные механизмы этой агрегации остаются не ясными.

Мультидоменные мышечные белки, такие как титин, миозин-связывающий белок С и некоторые другие (Н-белок, миомезин, обскурин), состоят из Ig-доменов и подобных им фибронектин III-подобных (FnIII) доменов. В поперечно-полосатых мышцах эти белки являются важными структурными компонентами актинсодержащих и миозинсодержащих нитей, участвующими в формировании высокоупорядоченной саркомерной структуры, а также в запуске и регуляции мышечного сокращения. В гладких мышцах предполагается аналогичная роль титина в поддержании структурно-функциональной целостности сократительного аппарата гладкомышечных клеток, несмотря на отсутствие точных данных о локализации этого белка. В ряде работ продемонстрирована способность отдельных доменов титина к агрегации *in vitro* в условиях, приближенных к физиологическим (Borgia et al., 2013; Wright et al., 2005). Предполагается, что при растяжении саркомера разворачивание

Ig-доменов титина раскрывает скрытые гидрофобные участки, что может способствовать агрегации (Rief et al., 1997; Minajeva et al., 2001).

Научный интерес изучения агрегационных свойств вышеуказанных мышечных белков связан еще и с тем, что в ряде исследований высказано предположение, что укороченные молекулы титина, экспрессирующиеся при развитии дилатационной кардиомиопатии, могут не встраиваться в саркомер, а накапливаться в виде внутриклеточных агрегатов, которые могут проявлять цитотоксичность и нарушать процесс «контроля качества белка» по механизму «пептидного яда» (Herman et al., 2012; Schafer et al., 2017; Fomin et al., 2021; Kellermayer et al., 2024). Предполагается, что и укороченная форма миозин-связывающего белка С, обнаруженная при развитии гипертрофической кардиомиопатии, также может участвовать в процессе формирования белковых агрегатов, нарушающих работу убиквитин-протеосомальной системы в клетке (Sarikas et al., 2005; Zolk et al., 2006; Mearini et al., 2008).

Однако несмотря на приведенные данные, указывающие, в частности, на высокую склонность титина и миозин-связывающего белка С (С-белка) к агрегации, до сих пор не установлено, образуются ли *in vivo* амилоидные агрегаты этих белков, а если образуются, то являются ли они функциональными или патологическими? Таким образом, вопросы о типе белковых агрегатов (амилоидные/неамилоидные, патологические/функциональные) мультидоменных мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов, структурных изменениях в этих белках при агрегации, а также о роли подобной агрегации в мышечных клетках остаются открытыми. Ответы на эти вопросы, скорее всего, скрываются в особенностях структурных изменений, которые происходят при агрегации вышеуказанных белков.

Цель диссертационной работы заключалась в проведении комплексного *in vitro* исследования агрегационных свойств гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка для выяснения типа белковых агрегатов и структурных изменений при агрегации исследуемых белков.

Задачи:

1. Исследовать динамику агрегации гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка методом динамического рассеяния света;
2. Исследовать морфологические особенности агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка методом электронной и атомно-силовой микроскопии;
3. Исследовать амилоидную природу агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка методом спектрофлуориметрии с использованием красителя тиофлавина Т, а также методом рентгеновской дифракции;
4. Используя различные методы структурного анализа (круговой дихроизм, инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье, синхротронное малоугловое рентгеновское рассеяние), исследовать изменения структуры титина и С-белка при их агрегации;
5. Исследовать влияние агрегатов титина и С-белка на выживаемость гладкомышечных клеток аорты крысы и фибробластов человека.

Методология и методы диссертационного исследования

Диссертационная работа выполнена с использованием широкого набора современных научных методов биофизики и биохимии, таких как: динамическое рассеяние света, просвечивающая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, флуоресцентная спектроскопия с красителем тиофлавин Т, круговой дихроизм, ИК-Фурье спектроскопия, рентгеновская дифракция, малоугловое рентгеновское рассеяние с использованием синхротронного излучения, дифференциальная сканирующая калориметрия, конфокальная микроскопия, выделение и очистка мышечных белков, ДСН-гель-электрофорез, вестерн-блот анализ, методы биоинформатического анализа, которые являются адекватными и соответствуют поставленным целям и задачам. Полученные данные проанализированы с использованием современных методов статистической обработки.

С целью проведения комплексного *in vitro* исследования агрегационных свойств титина и С-белка было проведено их выделение из мышечной ткани с последующей очисткой методами гель-фильтрационной и ионообменной хроматографии. Выбор С-белка был сделан

на основании того, что он является основным компонентом поперечного саркомерного цитоскелета в миофибриллах сердечной и скелетных мышц позвоночных животных. Выбор гладкомышечного титина – более низкомолекулярного аналога титина поперечно-полосатых мышц (в которых этот белок является основным компонентом продольного саркомерного цитоскелета) был сделан с целью минимизации методических сложностей при исследовании гигантских молекул данного белка. Миозин-связывающий белок С (С-белок), а также актин были получены из скелетных мышц кролика. Эксперименты с использованием данного лабораторного животного были одобрены Комиссией по биоэтике и биологической безопасности (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, разрешение № 30 от 10 сентября 2019 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента. Животные были предоставлены виварием ИТЭБ РАН. Титин был получен из гладкомышечной ткани желудков курицы. Куриные желудки были предоставлены птицефабрикой, расположенной недалеко от города Пущино (ООО «Шепиловская птицефабрика»), имеющей все необходимые лицензии на работу с животными, в частности, с курами. Для исследования цитотоксичности агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка были использованы культуры клеток фибробластов и гладкомышечных клеток, полученные в Лаборатории фармакологической регуляции и клеточной резистентности ИТЭБ РАН.

Научная новизна

Впервые показано, что гладкомышечный титин и скелетномышечный миозин-связывающий белок С (С-белок) формируют амилоидные агрегаты с аморфной морфологией. Агрегаты образуются за относительно короткие временные интервалы (в течение 5-10 мин для С-белка, 20 мин для изоформы гладкомышечного титина с м.м. 1500 кДа и в течение 60 мин для изоформы гладкомышечного титина с м.м. 500 кДа). Методами структурного анализа выявлено, что формирование амилоидной кросс- β структуры в агрегатах титина и С-белка происходит на этапе их олигомеризации, т.е., на самой начальной стадии процесса агрегации. Высказано предположение о наличии внутри олигомеров титина и С-белка участков с кросс- β структурой, которые способствуют в дальнейшем формированию более крупных агрегатов.

Впервые обнаружено, что при формировании амилоидных агрегатов титина и С-белка не происходит изменений в их вторичной структуре. В частности, процент компонентов вторичной структуры (α -спирали, β -участки и неупорядоченная структура) остается неизменным при агрегации исследуемых белков. Учитывая, что у большинства белков при формировании амилоидных агрегатов происходят изменения во вторичной структуре, направленные на увеличение количества β -участков, указанное выше свойство исследуемых мышечных белков ставит их в ряд уникальных объектов, имеющих отличительные особенности амилоидной агрегации.

Показано, что процесс агрегации титина является обратимым, в частности, при помещении агрегатов титина в раствор с более высокой ионной силой (~ 0.6 М) наблюдалась их дезагрегация. На основании полученных данных предложена гипотеза о возможной функциональной роли амилоидной агрегации титина и других белков, состоящих из Ig- и FnIII-доменов, в мышечных клетках *in vivo*.

При исследовании двух типов амилоидных агрегатов гладкомышечного титина, различающихся по морфологии, способности к дезагрегации и по степени связывания красителя тиофлавина Т, не было выявлено различий на структурном уровне. Сделан вывод, что формирование гладкомышечным титином амилоидных структур происходит в первые часы агрегации (появляется четвертичная кросс β -структура), а дальнейшее укрупнение агрегатов происходит за счёт взаимодействия между собой сформированных амилоидных надмолекулярных структур.

Впервые показано, что амилоидные агрегаты гладкомышечного титина нарушают адгезию гладкомышечных клеток и фибробластов человека. Выдвинуто положение, что нарушение адгезии клеток связано с топологическими особенностями поверхности, которую формировали амилоидные агрегаты белка и на которой находились клетки. Посчитанные значения среднеквадратичной шероховатости поверхности, формируемой амилоидными агрегатами титина гладких мышц, были сопоставимы с описанными в литературе значениями антиадгезивных поверхностей, которые формируют некоторые специально для этого

созданные полимеры. Таким образом, впервые предложен новый механизм влияния белковых амилоидных агрегатов на адгезию и выживаемость клеток. Непосредственного цитотоксического действия амилоидных агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка выявлено не было.

Положения, выносимые на защиту

1. Гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок формируют *in vitro* амилоидные аморфные агрегаты с четвертичной кросс-β структурой.
2. Процесс амилоидной агрегации титина является обратимым.
3. Формирование амилоидных агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка происходит без изменений во вторичной структуре белков.
4. Гладкомышечный титин формирует два типа аморфных амилоидных агрегатов.
5. Амилоидные агрегаты гладкомышечного титина не проявляют цитотоксического действия, но нарушают адгезию клеток.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов диссертационной работы определяется применением большого количества современных биофизических методов исследования, использованием высококачественных расходных материалов и современного передового оборудования. Все эксперименты проводились не менее чем в трёх независимых повторах. Результаты, полученные в экспериментах по цитотоксичности, статистически оценивались с использованием критерия Манна-Уитни (U) при доверительной вероятности $P \leq 0,05$. Представленные данные отражают средние значения (M) и стандартные ошибки (m). Одним из важных признаков достоверности является согласованность данных, полученных при анализе вторичной структуры белков с использованием двух физически различных методов – кругового дихроизма и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье. Применение совокупности методов электронной и атомно-силовой микроскопии, флуоресцентного анализа, динамического светорассеяния, кругового дихроизма, ИК-Фурье спектроскопии и синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния обеспечило верификацию полученных результатов при исследовании структурной организации белков. Достоверность положений, выносимых на защиту, подтверждается их соответствием экспериментально установленным закономерностям, описанным в серии публикаций и воспроизведённым с использованием независимых методов анализа.

Апробация результатов работы

Результаты исследований и основные положения работы были представлены и обсуждены на российских и международных конференциях, в частности, на: Российской конференции с международным участием «Experimental and computational biomedicine» (Екатеринбург, 2016); Международных симпозиумах «Biological motility» (Пушино, 2016, 2019); Всероссийских конференциях «Экспериментальная и теоретическая биофизика (Пушино, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022); форуме «Наука будущего – наука молодых» (Нижний Новгород, 2017); Международных Пушкинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022); XXX зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2018); Отчетной годовой конференции ИТЭБ РАН (Пушино, 2018); 47-ой Европейской мышечной конференции (Budapest, Hungary, 2018); 42-ой Европейской мышечной конференции (Amsterdam, Netherlands, 2013); Международной школе-конференции EMBO «Protein quality control: From mechanisms to disease» (Costa de la Calma (Mallorca), Spain, 2019); 64-ой Ежегодной международной конференции Biophysical Society (San Diego, California, 2020).

Личный вклад автора

Автором разработана концепция исследования, сформулированы цели и задачи работы, проведены анализ и интерпретация результатов, а также подготовка и написание научных публикаций. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов по выделению, очистке и использовании исследуемых белков в исследовании

с помощью электронной микроскопии и флуориметрии. Автор лично участвовал в получении и анализе данных, полученных методами атомно-силовой микроскопии, динамического светорассеяния, инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, кругового дихроизма, рентгеновской дифракции, а также лично участвовал в экспериментах, проводимых на клеточных культурах.

Часть исследований была проведена совместно: 1) с Национальной лабораторией физики высоких энергий на базе Фотонной фабрики (Цукуба, Япония, метод малоуглового рентгеновского рассеяния с использованием синхротронного излучения); 2) с лабораторией биофизики и радиационной биологии Семмельвейского университета (Будапешт, Венгрия, атомно-силовая микроскопия молекул и олигомеров гладкомышечного титина); 3) с лабораторией фармакологической регуляции и клеточной резистентности ИТЭБ РАН (рук. к.б.н. Кобякова М.И., исследование цитотоксичности агрегатов); 4) с лабораторией новых методов в биологии ФИЦ ПНЦБИ РАН (рук. к.ф.-м.н. Пермяков С.Е., ИК-Фурье спектроскопия мышечных белков); 5) с группой структурных исследований макромолекулярных комплексов Института белка РАН (рук. к.ф.-м.н. Габдулхаков А.Г., структурный анализ белков методом рентгеновской дифракции); 6) с лабораторией биоинформатики Института белка РАН (рук. д.ф.-м.н. Галзитская О.В., биоинформатический анализ); 7) с группой термодинамики белка Института белка РАН (рук. д.ф.-м.н. Потехин А.С., калориметрические исследования методом ДСК); 8) с лабораториями ЯМР-исследований биосистем ИТЭБ РАН (рук. к.б.н. Тимченко М.А.) и физики белка Института белка РАН (рук. д.ф.-м.н., проф., чл.-корр. РАН Филькенштейн А.В., структурные исследования белковых агрегатов методом АСМ); 9) с лабораторией наноструктур и нанотехнологий ИТЭБ РАН (рук. д.х.н. Шляпников Ю.М., исследование микроструктуры поверхности агрегатов титина методом АСМ); 10) с сектором оптической микроскопии и спектроскопии Института биофизики клетки РАН – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН (рук. д.ф.-м.н. Пеньков Н.В., исследование агрегатов белков методом динамического светорассеяния).

Степень разработанности темы

Исследования агрегационных свойств мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов, в том числе титина и С-белка, начались в середине 80-х годов прошлого века (Kimura et al., 1984; Bennett et al., 1985; Koretz et al., 1993). В частности, в 1993 году в работе (Koretz et al., 1993) впервые была показана способность титина, выделенного из скелетных мышц кролика, формировать *in vitro* пучки линейных фибрилл. Амилоидные свойства титина и других белков при этом не изучались. Первые исследования типа белковых агрегатов (амилоидные/неамилоидные), формируемых мышечными белками суперсемейства иммуноглобулинов, были инициированы в начале XXI века сотрудниками ИТЭБ РАН под руководством д.б.н. Подлубной З.А. Они впервые показали, что титин, С-белок, Х-белок и Н-белок, выделенные из скелетных мышц кролика, способны формировать различные типы агрегатов, некоторые из которых проявляли способность связывать такие «амилоидные» красители, как Конго красный и тиофлавин Т (Марсагишвили и др., 2005; Подлубная, Марсагишвили, 2008; Marsagishvili et al., 2005). На основании этих данных авторы сделали вывод об амилоидной природе агрегатов исследуемых мышечных белков. Однако исследования, направленные на выявление четвертичной кросс- β -структуры в агрегатах мышечных белков, проведены не были. За пределами понимания также оставался вопрос о структурных изменениях, происходящих в молекулах исследуемых белков при формировании агрегатов.

Известны также исследования, посвященные изучению особенностей агрегации отдельных Ig-доменов титина (Wright et al., 2005; Borgia et al., 2015). Было обнаружено повышение способности к агрегации отдельных доменов титина в случае увеличения более 40% идентичности их аминокислотных последовательностей. Авторы высказали предположение о возможных негативных последствиях подобной агрегации в мышечных клетках.

Таким образом, описанные литературные данные характеризуют мышечные белки суперсемейства иммуноглобулинов как интересные объекты для изучения процесса белковой агрегации.

Теоретическая значимость работы

Полученные результаты о формировании амилоидных агрегатов исследуемыми мышечными белками расширяют представления о процессе белковой агрегации и, в частности, об особенностях амилоидной агрегации белков суперсемейства иммуноглобулинов на структурном уровне. Полученные данные углубляют представления о возможных различиях между функциональными и патологическими амилоидными агрегатами, показывая на примере мультидоменных мышечных белков механизм формирования нетоксичных амилоидных агрегатов, способных дезагрегировать. Эти знания необходимы для построения молекулярных моделей разных типов амилоидной агрегации, что позволит в дальнейшем находить способы влияния на процесс амилоидообразования.

Практическая значимость работы

Практическая ценность работы заключается в том, что полученные данные о структурных изменениях в исследуемых мышечных белках при агрегации *in vitro* могут быть использованы в биомедицине, например, для увеличения эффективности белковых лекарственных препаратов путём снижения возможной агрегации их белковых компонентов. Результаты исследования по влиянию амилоидных агрегатов на адгезию клеток могут быть использованы в биомедицине для создания специальных антиадгезивных материалов в качестве покрытия для вживляемых электродов или электростимуляторов.

Публикации

Основные положения диссертации опубликованы в 29 печатных работах, в том числе в 20 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и МИНОБРНАУКИ России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных WoS, Scopus, РИНЦ и RSCI).

Структура и объём работы

Диссертация изложена на 301 странице, включает 52 рисунка, 8 таблиц. Список литературы содержит 717 источников. Работа содержит следующие разделы: Оглавление, список использованных сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы изложены основные современные сведения о процессе агрегации белков, включающие механизмы агрегации белков, факторы, влияющие на процесс агрегации, а также данные об амилоидной агрегации. Описаны методы, которые применяют для изучения амилоидной агрегации белков. Отдельно приведена классификация функциональных и патологических амилоидных белков. Представлены данные о токсических свойствах патологических амилоидных агрегатов. Представлены данные об объектах исследований – мышечных мультидоменных белках: гладкомышечном титине и скелетномышечном С-белке; представлены результаты предыдущих исследований агрегации данных белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальный материал

Актин и миозин-связывающий белок С (С-белок) выделяли из скелетных мышц кролика. Все процедуры на животных были одобрены Комиссией по биоэтике и биологической безопасности (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, разрешение № 30 от 10 сентября 2019 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента. Операции на кроликах проводили под анестезией Золетилом (Virbac Sante Animale, Carros, Франция) (4 мг/кг, внутримышечно).

Титин был получен из гладкомышечной ткани желудков курицы. Куриные желудки были приобретены с птицефабрики, расположенной недалеко от города Пущино (ООО «Шепиловская птицефабрика»), имеющей все необходимые лицензии на работу с животными, в частности, с курами.

Культуры клеток фибробластов и гладкомышечных клеток для исследования цитотоксичности амилоидных агрегатов получены в Лаборатории фармакологической регуляции и клеточной резистентности ИТЭБ РАН.

Выделение и очистка белковых препаратов

Титин из гладких мышц желудков курицы выделяли по методу (Kim, Keller, 2002) с модификациями (Bobylev et al., 2016). Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом, используя $E_{280}^{1 \text{ мг/мл}} = 1.37$ (Trinick et al., 1984). Были отдельно получены две изоформы титина с молекулярными массами 1500 кДа (высокомолекулярная изоформа гладкомышечного титина – ГМТ_{ВМИ}) и 500 кДа (низкомолекулярная изоформа гладкомышечного титина – ГМТ_{НМИ}).

Выделение С-белка из скелетных мышц кролика производилась по методу, описанному в работе (Offer et al., 1973). Концентрацию белка определяли спектрофотометрически с помощью спектрофотометра SPECORD UV VIS, используя следующие значения коэффициентов экстинкции ($E_{280}^{1 \text{ мг/мл}}$): 1.09 (Starr, Offer, 1982).

Актин выделяли по методу, описанному в работе (Pardee, Spudich, 1982) из ацетонового порошка, приготовленного согласно (Feuer et al., 1948). Концентрацию актина определяли спектрофотометрическим методом, используя $E_{280}^{1 \text{ мг/мл}} = 1.09$ (Rees, Young, 1967).

Чистоту выделенного титина и С-белка проверяли методом ДСН-гель-электрофореза по методу (Fritz et al., 1989) и методом вестерн-блот анализа. Перенос белков на PVDF мембрану проводили по методу (Towbin et al., 1979). В работе использовались следующие первичные антитела: моноклональные 9D10-с (1:1000, DSHB, США), специфичные к титину, и поликлональные антитела М-190 (sc-67353, Santa cruz biotechnology, США), специфичные к С-белку. В качестве вторичных антител использовали антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США).

Для подтверждения чистоты полученных препаратов титина и С-белка, белковые фракции также анализировали методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией, исследование проводили согласно работе (Bobylev et al., 2021).

Для изучения цитотоксичности, а также для проведения исследований методами рентгеновской дифракции, ИК-Фурье и ДСК препараты белков или их агрегаты были лиофилизированы с целью последующего их разведения с нужной концентрацией. Образцы подвергались лиофилизации в приборе FreeZone 1L (Labconco, США) при температуре минус 56°C и давлении 0.013 мБ.

Условия формирования титином и С-белком амилоидных агрегатов

Для получения агрегатов очищенный белок (гладкомышечный титин (м.м. 500 кДа и 1500 кДа), С-белок) диализовали при 4°C против следующих растворов: 0.2 М KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0 и 0.15 М глицина-КОН, pH 7.0.

Динамическое рассеяние света

Образцы агрегатов титина исследовали через: 20, 40, 60, 120, 180 мин диализа против соответствующих буферных растворов. Последний образец оставляли в приборе для непрерывных измерений в течение 21 часа. В этом эксперименте образец титина, растворенный в буферном растворе, содержащем 0.6 М KCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, pH 7.0 (колоночный буфер), принимали за начальную точку агрегации (0 мин). Поскольку вязкость препаратов белка варьировала из-за разного буферного состава, а расчеты размеров частиц на основе динамического рассеяния света (ДРС) зависят от вязкости, отдельно измеряли вязкость буферных растворов исследуемых образцов.

Для исследования агрегации С-белка, образец белка в буферном растворе, содержащем 0.3 М KCl, 4.8 мМ K₂HPO₄, 5.2 мМ KH₂PO₄, 0.1 мМ ДТТ, 0.1 мМ NaN₃, pH 7.0, при начальной концентрации 1 мг/мл и объеме 100 мкл, был перенесён в раствор, содержащий 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0 (объемом 900 мкл), путем постепенного разбавления до конечной концентрации 0.1 мг/мл для снижения ионной силы. Разбавление проводили медленно (в течение 5 мин) при температуре 4°C. Анализ проводили в течение 24 ч.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Для приготовления электронно-микроскопических образцов использовали препараты белков с концентрацией 0.05-0.1 мг/мл. Каплю раствора или суспензии наносили на медные сетки, покрытые коллодиевой пленкой (2% коллодий в амилацетате фирмы SPI-CHEM, США), укрепленной углеродом на 30-60 сек. После удаления избытка суспензии полоской фильтровальной бумаги образцы окрашивали 2% водным раствором уранилацетата. Электронно-микроскопические исследования проводили на микроскопе JEM-100В при ускоряющем напряжении 100 кВ и увеличении 20000-40000х. Увеличение микроскопа было тестировано по паракристаллам параmioзина с периодичностью 14.5 нм.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

Для исследования агрегатов белков во всех случаях исследуемые образцы выдерживали на слюде в течение 5 мин, затем дважды промывали в течение 30 сек. водой, сушили газообразным азотом и анализировали структуру полученных комплексов методом атомно-силового микроскопа Integra-Vita (NT-MDT, Россия) с использованием кантилеверов NSG03 с радиусом кривизны наконечника 10 нм. Резонансная частота 47-150 кГц. Измерения проводились в полуконтактном (постукивающем) режиме. Полученные изображения были проанализированы с помощью Soft Nova (NT-MDT, Россия).

Для исследования отдельных молекул ГМТ (м.м. 1500 кДа) и его олигомеров 10-20 мкл образца титина, разведенного в буферном растворе, содержащем 0.6 М KCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, pH 7.0, наносили на поверхность свежесколотой слюды и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем, чтобы убрать несвязанные молекулы белков, а также соль, поверхность промывали дистиллированной водой и сушили газообразным азотом. Изображения титина и его олигомеров, связанных с поверхностью слюды, были получены с использованием прибора Cypher ES AFM (Asylum Research, Санта-Барбара, Калифорния, США). Измерения

проводились в полуконтактном (постукивающем) режиме. Сканирование проводили при 0,8-1,2 В, чтобы избежать прилипания образца к кончику кантилевера. Для сканирования использовались кантилеверы из нитрида кремния (Olympus) (AC160TS, резонансная частота ~300 кГц). При типичной частоте сканирования 0.7-1.4 Гц мы получали изображения с разрешением 512×512 пикселей или 1024×1024 пикселей с высотным, амплитудным и фазово-контрастным изображением. Полученные изображения были импортированы и проанализированы с помощью программного обеспечения Image 1.61 (Wayne Rasband, NIH). Для пространственной калибровки использовалась внутренняя калибровка АСМ. Автокорреляцию данных осевой высоты выполняли с использованием программного обеспечения IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR).

Для исследования поверхностей стёкол, покрытых амилоидными агрегатами ГМТ, образцы агрегатов ГМТ, а также образцы неагрегированного титина (в качестве контроля) наносили на свежеосколотую слюду или стекло на 5 мин, промывали деионизированной водой (Milli-Q) и сушили газообразным азотом. Изображения получали на атомно-силовом микроскопе SmartSPM™ 1000 (АИСТ-НТ, Москва, Россия) с кантилеверами fpN11 (НИИПП, Зеленоград, Россия), с радиусом кривизны острия 10-25 нм). Измерения проводились в полуконтактном (постукивающем) режиме с резонансной частотой 120-190 кГц. Для расчетов среднеквадратичной шероховатости поверхности (RMS) использовалось программное обеспечение Gwyddion (Чешский институт метрологии, Брно, Чехия).

Флуоресцентный анализ с красителем тиюфлавином Т

Амилоидная природа агрегатов титина и С-белка оценивалась по интенсивности флуоресценции ТТ (ТТ) (1 ТТ: 5 титина или С-белка (w/w)). Флуоресценцию измеряли при $\lambda_{ex}=440$ нм и $\lambda_{em}=488$ нм с использованием спектрофотометра Cary Eclipse (Varian, США). Спектр препарата белка измеряли пять раз и столько же раз прописывали спектр буфера.

Круговой дихроизм

Спектры кругового дихроизма (КД) до и после образования агрегатов титина и С-белка регистрировали на спектрополяриметре Jasco J-815 (JASCO Inc., Токио, Япония), используя кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0.1 см. Спектры кругового дихроизма измерялись в диапазоне длин волн 250–190 нм.

Для каждого исследуемого образца брали три повторения спектра. Обработку данных и графическое представление проводили в программе SigmaPlot. По спектру поглощения рассчитывали точную концентрацию белка по формуле: $C = \text{ABS}_{280}/l/\text{Ke}$ (где ABS_{280} – величина поглощения на длине волны 280 нм, l – длина оптического пути в см, Ke – коэффициент экстинкции). Полученные спектры были проанализированы с помощью программы (Spectra Manager Version 2, Spectra Analysis Version 2.02.06 (Build 1) Spectra Analysis Jasco). Вторичную структуру рассчитывали с помощью модуля CONTIN/LL программы CDPro (Sreerama, Woody, 2000). Среднеквадратичное отклонение (СКО) по программе CDPRO не превышало 6%.

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

Измерения проводились на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Scientific, США), оснащённом приставкой Smart Proteus с Пельтье-контролируемым кюветодержателем в режиме пропускания, в кювете из кристаллического фторида кальция с оптическим путем 4 мкм, используя МСТ детектор (охлаждение жидким азотом). Сканирование проводилось в диапазоне волновых чисел от 650 см^{-1} до $4\,000\text{ см}^{-1}$ с разрешением 1 см^{-1} , усреднение по 256 спектрам. Прибор откалиброван в соответствии с инструкциями компании-производителя прибора.

ИК спектры растворов препаратов титина в соответствующем буфере и спектры самого буфера измеряли при 20°C. Концентрация белка составляла 36-42 мг/мл. Оптический путь кюветы из CaF_2 рассчитывали для каждого измерения, исходя из величины оптической плотности исследуемого образца на 3404 см^{-1} , используя величину поглощения воды при

оптическом пути 1 мкм, равную 0.533 AU, с поправкой на концентрацию белка в пробе (Venyaminov, Prendergast, 1997). Анализ и расчеты элементов вторичной структуры в белке проводились, следуя принципам, описанным в работе (Goormaghtigh et al., 2009).

Рентгеновская дифракция

Лиофилизированные агрегаты белков растворяли в минимальном объеме деионизированной воды (Milli-Q) до концентрации более 10 мг/мл. Капли полученных препаратов белка помещали между концами покрытых воском стеклянных капилляров (диаметром ~1 мм), разделенных примерно на 1.5 мм для дальнейшего высушивания на воздухе. Это необходимо для выравнивания фибрилл. Буферные растворы (контроль) помещали в специальные стеклянные капилляры “для рентгеновской дифракции”. Дифракционные изображения были получены, используя Microstar X-ray генератор с оптикой HELIOX, который оснащен Platinun135 CCD детектором (X8 Proteum system, Bruker AXS). Использовалось Cu K α -излучение с $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$. Образцы располагали под прямым углом к рентгеновскому лучу с использованием четырехосного каппа-гониометра.

Синхротронное малоугловое рентгеновское рассеяние

Измерения синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (СМУРР) проводили на источнике с длиной волны 1.503 $\text{\AA}$ (Фотонная фабрика Национальной лаборатории физики высоких энергий, Цукуба, Япония). Раствор белка помещали в термостатируемую ячейку с окнами из слюды объемом 30 мкл. Данные регистрировали с помощью детектора 2D CCD X-ray detector. Фоновый сигнал от буферного раствора регистрировали до или после анализа раствора белка. Поправку на разницу в электронной плотности (контраст) между белком и растворителем, а также на искажения изображения и нелинейность вносили согласно стандартным методикам. Расстояние между образцом и детектором составляло 1.85 м, диапазон значений вектора рассеяния Q составлял 0.01-0.2 $\text{\AA}^{-1}$ (где $Q=4\pi \cdot \sin\theta/\lambda$ и 2θ – угол рассеяния). В качестве стандарта с известной молекулярной массой и размерами использовали бычий сывороточный альбумин. Форму частиц оценивали по тангенсу угла наклона $\log I$ к $\log Q$, где I – интенсивность рассеяния, Q – модуль вектора рассеяния (Feigin, Svergun, 1987). Зависимости $\log I$ от $\log Q$ в данных СМУРР аппроксимировали линейной регрессией. Коэффициенты корреляции (R^2) колебались от 0.92 до 0.99. Для расчетов использовали программы SAXTIM и SigmaPlot 2000.

Дифференциальная сканирующая калориметрия

Исследование стабильности гладкомышечного титина методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проводили на прецизионном сканирующем микрокалориметре СКАЛ-1 (Scal Co. Ltd, Россия) со стеклянными кюветами объемом 0.33 мл при скорости сканирования 1 град/мин и давлении 2.5 атм (Senin et al., 2000). Опыты проводили в 0.15 М растворе глицин–КОН при pH 7.0-7.5. Концентрация белка составляла 1.2 мг/мл. Измерения проводились при давлении 2 атм. Сбор данных производился автоматически с температурным шагом 0.1°K. Относительная погрешность определения калориметрической энтальпии ΔH_{cal} не превышала 10%.

Исследование цитотоксичности

Цитотоксическое действие агрегатов гладкомышечного титина (ГМТ) и С-белка на гладкомышечные клетки аорты крысы оценивали с помощью окраски клеток кристаллическим фиолетовым (Nomizu et al., 1995). Эксперимент по цитотоксичности проводили в среде DMEM/F12 без сыворотки с использованием фибрилл актина (Ф-актин) в качестве контроля. Цитотоксический эффект агрегатов ГМТ и С-белка оценивали по отношению разности между оптической плотностью в опыте и фоном к разности между оптической плотностью в контроле и фоном через 72 ч инкубации. Оптическая плотность была пропорциональна количеству живых клеток. Измерение проводили с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 (Tecan, Австрия).

Конфокальная микроскопия

Гладкомышечные клетки аорты крысы высаживали на покровные стекла, которые помещали в 6-луночные микропланшеты. Через сутки после посева, среда DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% ФСБ (Gibco, США) и 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США) заменяли на среду без сыворотки. После выдерживания в течение 2 часов в среде без сыворотки, добавляли агрегированный гладкомышечный титин, а также Ф-актин в качестве контроля. Окрашивание цитоскелетного Ф-актина гладкомышечных клеток аорты крысы проводили в среде следующего состава: ФСБ, 1% БСА, 0,25 нМ Phalloidin Atto 488 (Sigma Aldrich, США) в течение 25 мин в темноте при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (1мкг/мл) (Sigma Aldrich, США). Образцы исследовали с использованием конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica, Германия).

Световая микроскопия

Мезенхимальные стволовые клетки пульпы зуба человека (МСК ПЗЧ) высаживали в 96-луночный планшет, подвергали воздействию амилоидных агрегатов титина в течение 72 часов, затем образцы клеток в контроле и в присутствии агрегатов белка (500 мкг/мл) были исследованы с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Japan).

Исследование влияния амилоидных агрегатов титина на адгезию фибробластов

Для исследования адгезии клеток были использованы фибробласты кожи человека. Фибробласты кожи человека культивировали в среде для культивирования (концентрация клеток – 5×10^4 клеток/мл). Модифицированные стеклянные подложки (10×10 мм²) помещали в 9-луночные культуральные планшеты и стерилизовали УФ-облучением в течение 30 мин. Затем стекла заливались клеточной средой DMEM/F-12. Фибробласты кожи человека культивировали в среде DMEM/F-12 (Sigma Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) и 40 мкг/мл гентамицина при 37°C в условиях 5% содержания CO₂ в атмосфере в течение 48 и 72 часов. Окрашивание цитоскелетного Ф-актина клеток проводили в среде следующего состава: ФСБ, 1% БСА, 0,25 нМ Phalloidin Atto 488 (Sigma Aldrich, США) в течение 25 мин в темноте при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (1 мкг/мл) (Sigma Aldrich, США). Образцы исследовали с использованием конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica, Германия).

Расчет идентичности аминокислотной последовательности и неструктурированных участков титина и С-белка

С помощью программы BLAST рассчитывалась идентичность аминокислотной последовательности титина и С-белка. С помощью программы (алгоритма) IsUnstruct вычислялось предсказание неупорядоченности в структуре исследуемых белков (Necci et al., 2021). Данные для «медленного» паралога С-белка, С-белка сердечной мышцы, а также для титина курицы были взяты из базы данных UniProtKB. Данные для «быстрого» паралога С-белка были взяты из базы данных NCBI GenPept database.

Статистическая обработка данных

Результаты, полученные в экспериментах по цитотоксичности, статистически оценивали с помощью критерия Манна-Уитни U с доверительной вероятностью $P \leq 0.05$. Представленные данные представляют собой средние значения (M) и стандартные ошибки (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 1. ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ И ДИНАМИКИ АГРЕГАЦИИ ТИТИНА И С-БЕЛКА

1.1. Исследование динамики агрегации титина и С-белка методом ДСР

Исследование динамики агрегации низкомолекулярной изоформы гладкомышечного титина (ГМТ_{НМИ})

Как показали наши исследования, в препаратах неагрегированного (молекулярного) ГМТ_{НМИ} наблюдалось присутствие только двух размерных фракций, имеющих средние гидродинамические радиусы (Rh) ~ 12-13 нм (~90%) и 45 нм (~10%) (Рис. 1 А). Первая размерная фракция, по всей вероятности, соответствует молекулам ГМТ_{НМИ}, в то время как второй пик может указывать на наличие олигомерных форм данного белка. После 20 минут агрегации наблюдалось появление третьей размерной фракции, Rh которого составлял ~700 нм, что свидетельствует об относительно высокой скорости агрегации этого белка. Далее наблюдается рост данной размерной фракции относительно времени агрегации. И наконец, через 180 мин появляется размерная фракция с гидродинамическим радиусом Rh ~4500 нм, что указывает на появление стабильной фракции более крупных агрегатов белка, а размер частиц уже не детектируется. Через 21 час агрегации ГМТ_{НМИ} наблюдалось присутствие двух основных белковых фракций с Rh ~4500 нм (основная размерная фракция, соответствующая наиболее крупным агрегатам белка) и с Rh ~40 нм (по всей видимости является фракцией стабильных олигомеров) (Рис. 1 А).

Исследование динамики агрегации высокомолекулярной изоформы гладкомышечного (ГМТ_{ВМИ})

В образце, содержащем неагрегированную форму ГМТ_{ВМИ} (Рис. 1 Б (на графике 0 мин)), наблюдались только два хорошо разрешенных пика, представляющие собой размерные фракции со средним Rh ~16 нм (доминирующий пик ~73%) и 86 нм (второстепенный пик ~27%). Первый пик соответствует, скорее всего, молекулам ГМТ_{ВМИ}, тогда как второй может соответствовать олигомерам белка. Далее, в течение уже первых 20 мин агрегации наблюдалось появление размерной фракции (Rh ~479 нм), что свидетельствует о развитии процесса агрегации белка (Рис. 1 Б).

Через 40 мин эксперимента появилась устойчивая размерная фракция более крупных агрегатов ГМТ_{ВМИ} с гидродинамическим радиусом ~1175 нм (96.7%). Эта размерная фракция наблюдалась также через 50 и 60 мин агрегации (Рис. 1 Б). И наконец, пик, характеризующий размерную фракцию (Rh ~4500 нм), представляющий собой наиболее крупные агрегаты ГМТ, появляется через 50 мин агрегации. А через 60 мин агрегации уже не наблюдался пик (Rh ~50 нм), который, по всей видимости, представлял собой олигомерную форму белка ГМТ_{ВМИ}. Таким образом, процесс агрегации данной изоформы ГМТ_{ВМИ} от начала до формирования наиболее крупных частиц завершился уже к 60 минуте агрегации. И здесь также следует отметить, что скорость агрегации до появления наиболее крупных агрегатов (Rh ~4500 нм) у ГМТ_{ВМИ} больше (потребовалось 50 мин) по сравнению со скоростью агрегации ГМТ_{НМИ} (потребовалось 180 мин).

Одной из наших следующих задач при изучении динамики агрегации стало выяснение способности ГМТ_{ВМИ} к обратимой агрегации (деагрегации). После часа агрегации в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН при pH 7.0, образец агрегированного ГМТ_{ВМИ} был помещён в буферный раствор, содержащий 0.6 М KCl, 30 мМ KН₂РO₄, pH 7.0 (раствор, в котором обычно содержится молекулярная форма белка). При этом наблюдалось уменьшение доли частиц с большими гидродинамическими радиусами и увеличение числа частиц с меньшими гидродинамическими радиусами (Рис. 1 В).

Здесь следует отметить, что для ГМТ_{НМИ} способность к деагрегации в подобных условиях обнаружена не была. Следовательно, отличительными особенностями высокомолекулярной изоформы гладкомышечного титина относительно низкомолекулярной его изоформы

являются: способность агрегировать за более короткие временные интервалы и способность дезагрегировать в описанных выше условиях.

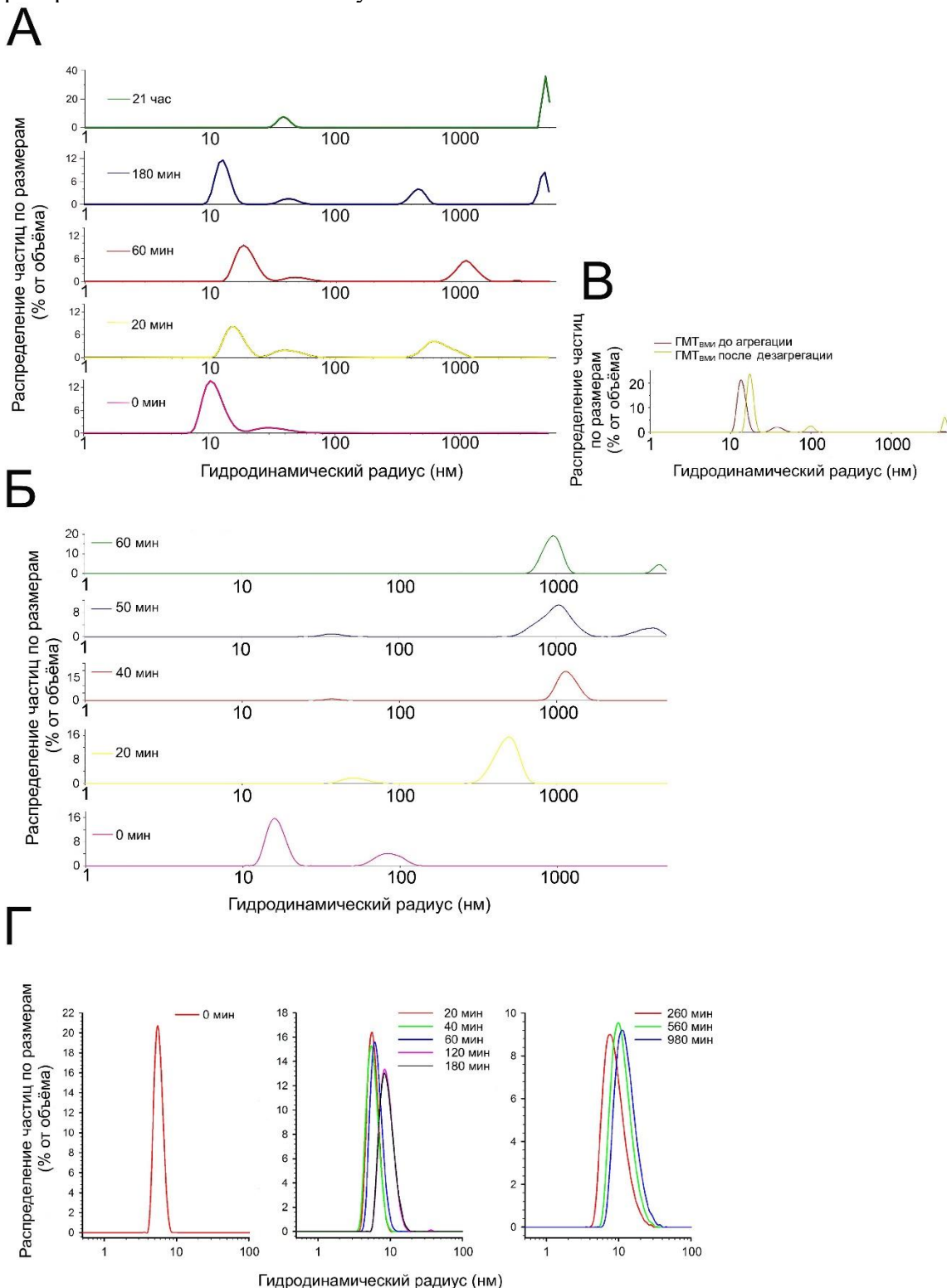


Рис. 1. Исследование динамики агрегации GMT_{нми}, GMT_{вми} и С-белка методом ДРС. А – Распределение частиц GMT_{нми} по размеру. Показано образование агрегатов и их рост во времени. Условия агрегации: 0.15 М глицин-КОН при pH 7.0. Измерения проводились при T=25°C. Б – Распределение частиц GMT_{вми} по размеру. Показано образование агрегатов и их рост во времени; В – распределение частиц GMT_{вми} после дезагрегации в течение 60 мин. Приведены два графика с распределениями частиц по размеру молекулярной формы GMT_{вми} и после дезагрегации в течение 60 мин (белок был предварительно агрегирован также в течение часа). Условия агрегации: 0.15 М глицин-КОН при pH 7.0. Измерения проводились при T=25°C; Г – Распределение частиц С-белка по размеру.

Показано образование агрегатов С-белка и их рост во времени. Условия агрегации: 0.15 М глицин-КОН при pH 7.0. Измерения проводились при T=10°C. Воспроизведено из [4, 12, 16] списка работ, опубликованных по теме диссертации.

Исследование динамики агрегации С-белка

Следующей целью нашего исследования было выяснение динамики агрегации С-белка. На рисунке 1 (Г) приведена серия графиков, показывающих присутствие всего одной размерной фракции С-белка, представленных для разных временных интервалов агрегации (5, 20-180, 260-980 мин). До образования агрегатов наблюдался только один хорошо разрешенный пик, представляющий собой размерную фракцию со средним гидродинамическим радиусом $R_h \sim 5.6$ нм ($\sim 99.9\%$). Этот пик соответствует, скорее всего, молекулам С-белка (Рис. 1 Г (0 мин)).

Мы наблюдали одну преобладающую размерную фракцию ($\sim 99.0\%$) в течение всего времени измерения (Рис. 1 Г). Установлено, что за период 20-980 мин этот пик, представляющий собой размерную фракцию, смещается в сторону увеличения размера до $R_h \sim 13$ нм. Через 980 минут R_h этой размерной фракции перестал увеличиваться. Мы предполагаем, что увеличение этой размерной фракции (от $R_h \sim 5.6$ нм до $R_h \sim 13$ нм) связано с образованием олигомеров С-белка. Если считать, что образующиеся агрегаты/олигомеры имеют сферическую форму, то олигомеры ($R_h \sim 13$ нм) состоят из ~ 10 -12 мономеров, исходя из того, что $R_h \sim 5.6$ нм это размер одной молекулы С-белка.

Таким образом, можно заключить, что в первые минуты агрегации С-белок формирует наиболее крупные частицы, которые седиментируют и не участвуют в дальнейшем измерении, а зафиксированная нами дальнейшая агрегация является образованием и ростом фракции стабильных олигомеров. Поэтому С-белок по сравнению с ГМТ имеет более высокую скорость агрегации. Также необходимо учитывать в целом, что скорость агрегации, показанная для всех исследуемых объектов, является относительно высокой. Ещё один вывод, который можно сделать – это отсутствие как такового лаг-периода и стадии зародышеобразования. Это является отличительной особенностью процесса агрегации исследуемых белков.

Таким образом, агрегация трёх исследованных белков – двух изоформ гладкомышечного титина и миозин-связывающего белка С, характеризуется относительно высокой скоростью и отсутствием выраженной стадии нуклеации (лаг-периода). При этом титин формирует крупные агрегаты с различной динамикой роста и дезагрегации, тогда как миозин-связывающий белок С не демонстрирует заметного увеличения агрегатов; наблюдается только незначительное укрупнение стабильных олигомеров.

1.2. Исследование морфологии агрегатов титина и С-белка

Исследование морфологии агрегатов низкомолекулярной изоформы гладкомышечного титина методами ПЭМ и АСМ

На рисунке 2 представлены электронные микрофотографии аморфных агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в течение 3 часов (Рис. 2 А) и 24 часов (Рис. 2 Б). Можно отметить, что аморфные агрегаты, сформированные в течение 24 часов, состоят из более крупных частиц (Рис. 2 Б), чем агрегаты, которые сформированы в течение 3 часов.

По данным АСМ на полученных изображениях агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в течение 3 часов, наблюдались скопления частиц сферической формы до 4 мкм в ширину и до 400 нм в высоту (Рис. 3 А). При этом диаметр отдельных крупных сферических частиц составлял ~ 1 мкм. Наблюдались также и другие более мелкие (ветвящиеся) агрегаты, высота которых составляла ~ 45 -50 нм, а диаметр ~ 2 -3 мкм (Рис. 3 А (красная стрелка)). Данные агрегаты в свою очередь также состоят из более мелких сферических частиц, диаметром 50-70 нм. Агрегаты ГМТ_{нми}, сформированные в течение 24 часов, по данным АСМ представляли собой разветвленные цепи, состоящие из сферических агрегатов диаметром ~ 300 -500 нм и высотой до 35-40 нм, проходящих через все поле зрения (Рис. 3 Б). По-видимому,

наблюдаемые короткие ветвящиеся структуры после 3 часов агрегации (Рис. 3 А (стрелка)) являются предшественниками крупных ветвящихся структур (Рис. 3 Б).

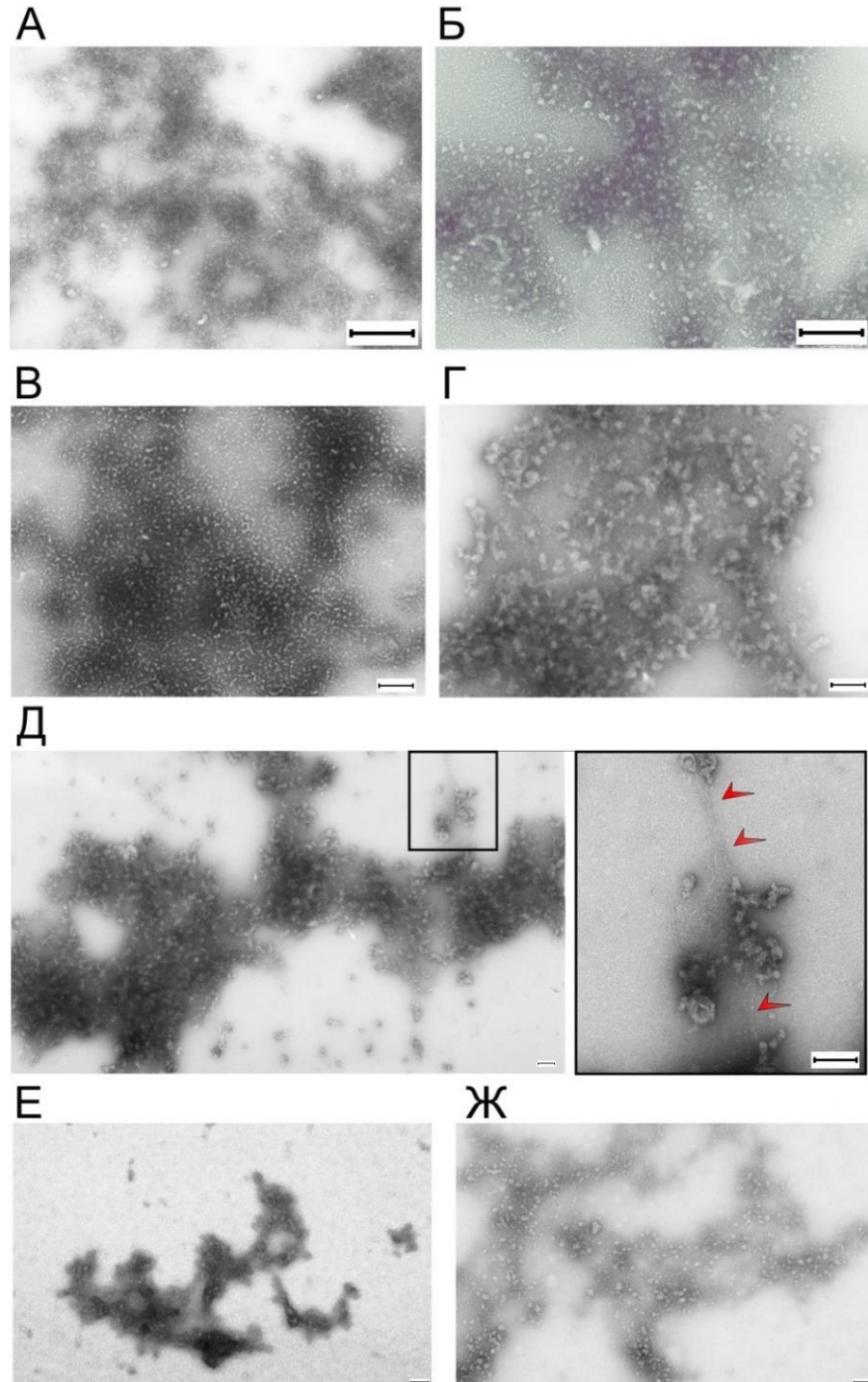


Рис. 2. ПЭМ негативно окрашенных агрегатов GMT_{HMI}, GMT_{BMI} и С-белка. А – Аморфные агрегаты GMT_{HMI}, сформированные в течение 3 часов; Б – Аморфные агрегаты GMT_{HMI}, сформированные в течение 24 часов, Шкала 500 нм; В – Аморфные агрегаты GMT_{HMI}, сформированные в течение 1 часа; Г – Аморфные агрегаты GMT_{BMI}, сформированные в течение 24 часов; Д – Аморфные агрегаты GMT_{BMI}, сформированные в течение 24 часов, у которых показано наличие белковых нитей диаметром ~4 нм между аморфными агрегатами (показаны красными стрелками на вставке), Шкала 100 нм; Е – Аморфные агрегаты С-белка, сформированные в течение ~5 мин; Ж – Аморфные агрегаты С-белка, сформированные в течение 24 часов. Шкала 100 нм. Условия формирования агрегатов всех белков: 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0, 4°C. Для окрашивания использовался 2% водный раствор уранилацетата. Воспроизведено из [9, 12, 16] списка работ, опубликованных по теме диссертации.

Исследование морфологии агрегатов высокомолекулярной изоформы гладкомышечного титина методами ПЭМ и АСМ

На рисунке 2 также представлены электронные микрофотографии аморфных агрегатов ГМТ_{ВМИ}, сформированных в течение 1 часа (Рис. 2 В) и 24 часов (Рис. 2 Г, Д). Аналогично ГМТ_{НМИ} (Рис. 2 Б), аморфные агрегаты ГМТ_{ВМИ}, сформированные в течение 24 часов, состояли из более крупных частиц, чем агрегаты, которые сформированы в течение 1 часа. В ряде случаев между аморфными агрегатами наблюдались нитевидные структуры диаметром ~4 нм (представленные, скорее всего, молекулами титина) (Рис. 2 Д). Таким образом, можно предположить, что в агрегации, в процессе формирования межмолекулярных связей, может участвовать не вся молекула белка.

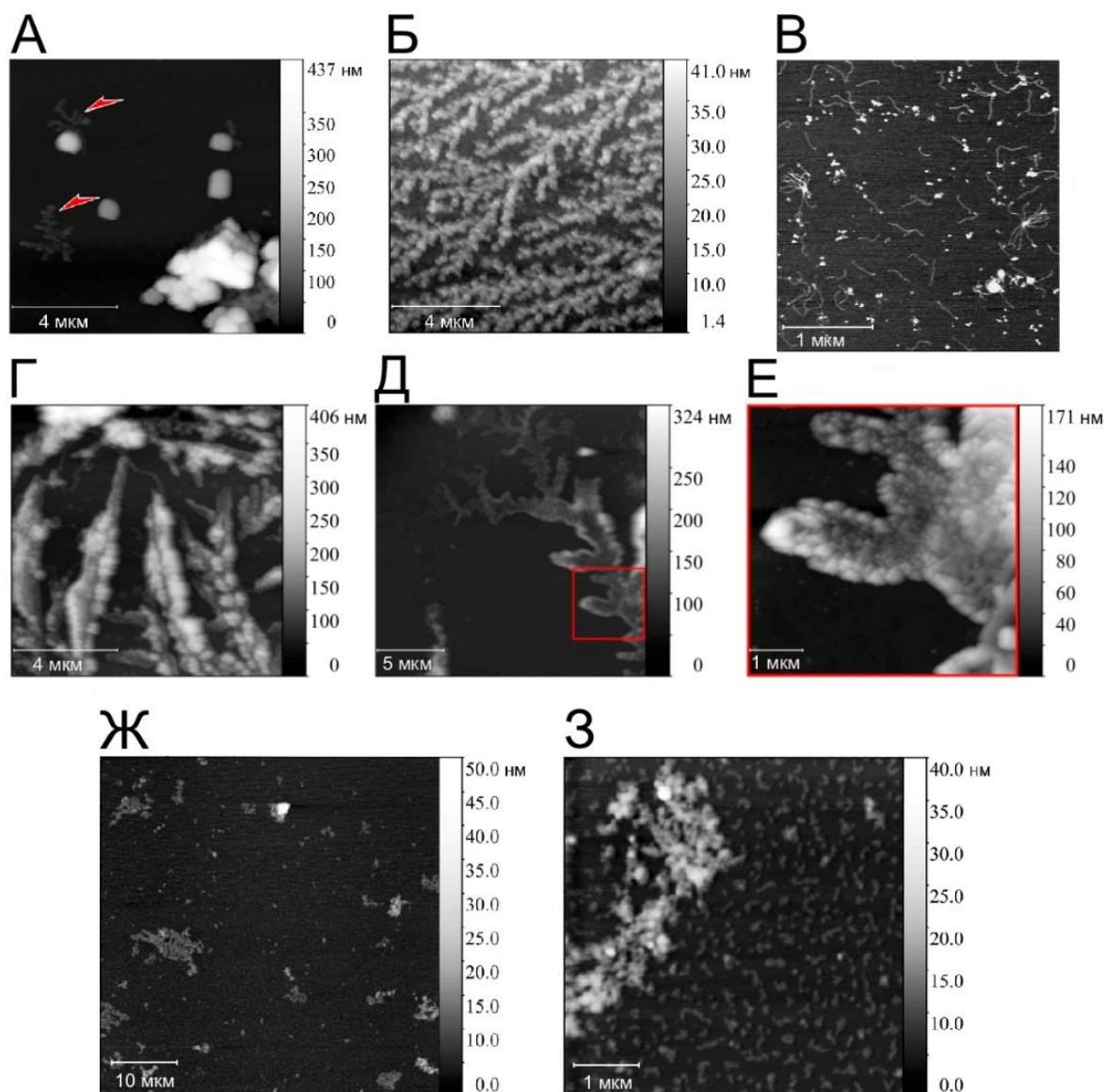


Рис. 3. Атомно-силовая микроскопия агрегатов ГМТ_{НМИ}, ГМТ_{ВМИ} и С-белка, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0, 4°C (А,Б,Г,Д,Е,Ж,3) и молекулярная форма ГМТ_{ВМИ} в колоночном буфере (0.6 М КСl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, pH 7.0.) (В). А – Аморфные агрегаты ГМТ_{НМИ}, сформированные в течение 3 часов; Б – Аморфные агрегаты ГМТ_{НМИ}, сформированные в течение 24 часов; В – Отдельно лежащие нитевидные молекулы ГМТ_{ВМИ} и олигомеры; Г – Аморфные агрегаты ГМТ_{ВМИ}, сформированные в течение 1 часа; Д, Е – Аморфные агрегаты ГМТ_{НМИ}, сформированные в течение 24 часов; Ж – Аморфные агрегаты С-белка, сформированные в течение 24 часов; 3 – Аморфные агрегаты и олигомеры С-белка, сформированные в течение 24 часов. Воспроизведено из [6, 12, 16] списка работ, опубликованных по теме диссертации.

Методом АСМ высокого разрешения в препаратах молекулярной формы ГМТ_{ВМИ} нами было обнаружено, что, как и в случае с титином поперечно-полосатых мышц (Kellermayer et. al., 2003; Tskhovrebova, Trinick, 2003; Vikhlyantsev et. al., 2011), молекулы ГМТ_{ВМИ} имеют форму нити толщиной 3–4 нм и длиной ~300 нм (в среднем) с шаровидной головкой на одном конце нити (Рис. 3 В). Однако, кроме отдельных молекул, обнаружены и олигомеры этого белка, представляющие собой несколько молекул ГМТ_{ВМИ}, связанных друг с другом в одной точке (центр олигомера) (Рис. 3 В и 5 В). Подобные олигомеры были обнаружены ранее в препаратах титина, выделенных из скелетных мышц кролика (Kellermayer et. al., 2003).

По данным АСМ, после 1 ч агрегации ГМТ_{ВМИ} наблюдались крупные аморфные структуры длиной в несколько микрометров и высотой до 350 нм (Рис. 3 Г). Через 24 ч агрегации они имели вид ветвящихся уплощенных структур длиной более 10 мкм и высотой 200–250 нм (Рис. 3 Д, Е).

Исследование морфологии агрегатов С-белка методами ПЭМ и АСМ

На рисунке 2 представлены электронные микрофотографии аморфных агрегатов С-белка, сформированных в течение ~5 мин (Рис. 2 Е) и 24 часов (Рис. 2 Ж). В отличие от ГМТ, аморфные агрегаты С-белка, сформированные в течение 5 мин и 24 часов, имеют приблизительно одинаковый размер частиц внутри аморфных агрегатов. Также можно отметить, что на электронных микрофотографиях, сформированных в течение 24 часов, помимо аморфных агрегатов присутствуют олигомеры диаметром ~40 нм (Рис. 2 Ж).

Далее были проведены исследования агрегатов С-белка методом АСМ. Поскольку по данным ПЭМ разницы между аморфными агрегатами С-белка, сформированными в течение первых минут агрегации и 24 часов агрегации, обнаружено не было, наибольший интерес представляли агрегаты, сформированные в течение 24 часов из-за наличия олигомеров. На полученных изображениях АСМ наблюдались крупные аморфные агрегаты длиной до 4 мкм и высотой ~25-35 нм (Рис. 3 Ж, 3). Также были обнаружены небольшие сферические структуры диаметром ~50 нм и высотой ~10 нм и короткие вытянутые структуры длиной до 200 нм, шириной ~50-60 нм и высотой 10-15 нм. Небольшие сферические структуры диаметром ~50 нм, по-видимому, являются олигомерами С-белка.

Таким образом, все исследованные белки – гладкомышечный титин (обе изоформы) и С-белок, формируют исключительно аморфные агрегаты, не содержащие фибриллярных структур. Эти агрегаты построены из более мелких сферических компонентов и не демонстрируют признаков упорядоченной амилоидной укладки на морфологическом уровне. Существенной особенностью агрегации титина является её частичный характер: в формировании агрегатов участвуют не целые молекулы, а отдельные доменные участки, что подтверждается наблюдением нитевидных структур, соединяющих агрегаты. С-белок формирует стабильные олигомеры, количество которых значительно наряду с крупными аморфными агрегатами, в то время как титин образует в основном крупные разветвлённые структуры. Полученные морфологические данные полностью согласуются с результатами, полученными методом динамического светорассеяния, подтверждая наличие как крупных агрегатов, так и олигомерных форм.

ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И АМИЛОИДНЫХ СВОЙСТВ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО ТИТИНА И СКЕЛЕТНОМЫШЕЧНОГО С-БЕЛКА

2.1. Исследование амилоидных свойств титина и С-белка

Исследование агрегатов С-белка и титина методом рентгеновской дифракции

На рисунке 4 (А–Г) представлены данные, полученные методом рентгеновской дифракции на выровненных препаратах ГМТ и С-белка. Важно отметить, что у всех исследуемых агрегатов были обнаружены рефлексы ~10 Å и ~4.6-4.8 Å, которые по литературным данным соотносят с четвертичной кросс-β-структурой. У всех исследуемых агрегатов рефлекс ~10 Å, который указывает на расстояние между β-листами, является размытым и кольцевым. Однако у С-белка рефлекс ~4.6 Å, который указывает на расстояние между полипептидными цепями

в кросс- β -структуре, также размыт (Рис. 4 Г), в то время как у ГМТ данный рефлекс является ярко выраженным (Рис. 4 А–В). Также отдельно следует отметить, что четвертичная кросс- β -структура присутствовала у агрегатов ГМТ_{ВМИ}, сформированных в течение 1 часа (Рис. 4 Б). Таким образом, 60 минут агрегации данному белку достаточно чтобы сформировать амилоидные структуры.

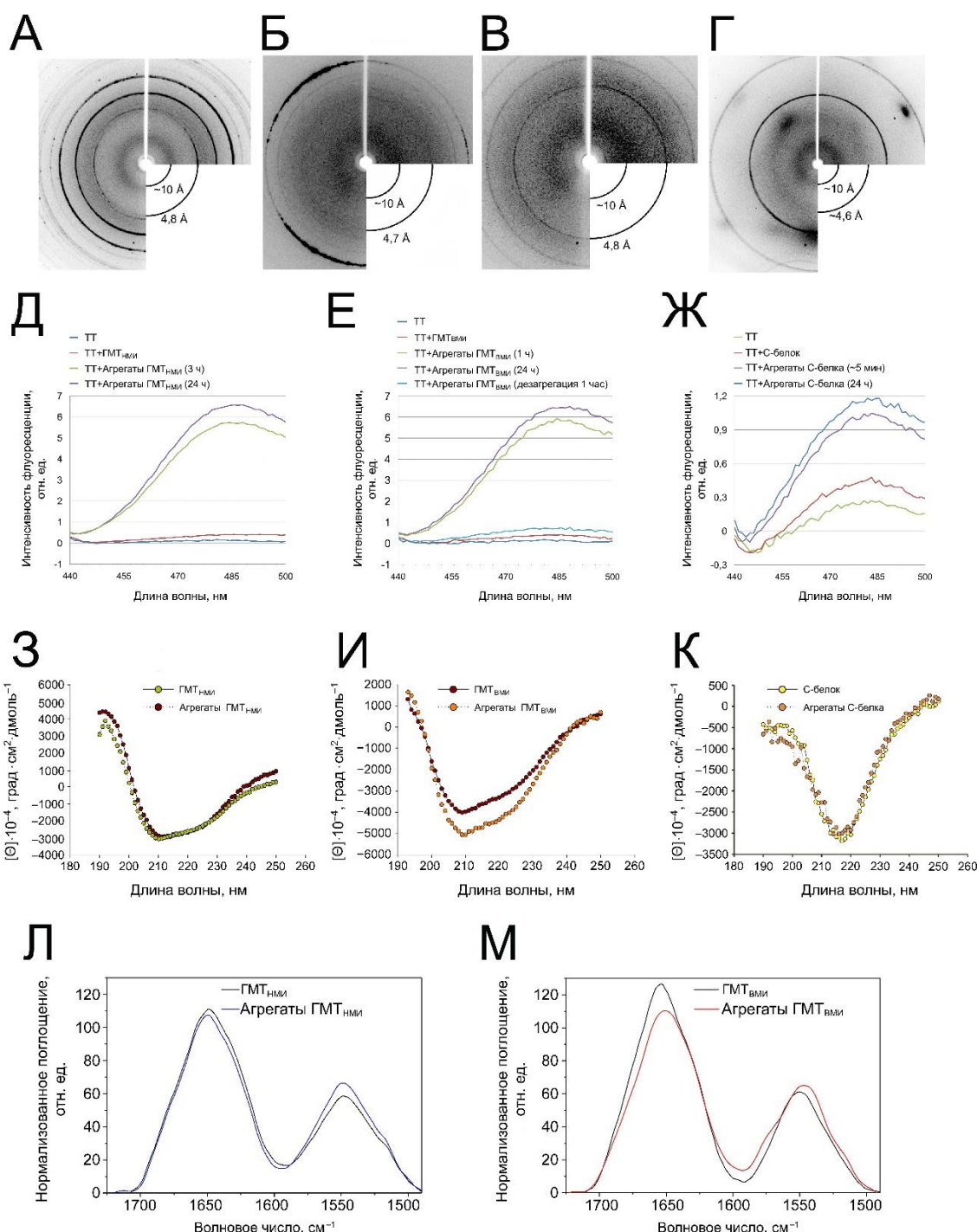


Рис. 4. А – Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов ГМТ_{НМИ}, сформированных в течение 24 часов. Размытый кольцевой рефлекс ~ 10 Å и выраженный кольцевой рефлекс ~ 4.6 Å подтверждают наличие кросс- β -структуры; Б – Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов ГМТ_{ВМИ}, сформированных в течение 1 часа. Размытый кольцевой рефлекс ~ 10 Å и слабо выраженный кольцевой рефлекс ~ 4.7 Å подтверждают наличие кросс- β -структуры; В – Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов ГМТ_{ВМИ}, сформированных в течение 24 часов. Размытый кольцевой рефлекс ~ 10 Å и выраженный кольцевой рефлекс ~ 4.8 Å подтверждают наличие кросс- β -структуры; Г – Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов С-белка, сформированных в течение 24 часов. Обнаружены 2 размытых кольцевых рефлексов ~ 10 Å и ~ 4.6 Å,

которые подтверждают наличие кросс-β-структуры; Д – Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии ГМТ_{нми} и агрегатов этого белка, сформированных в течение 3 и 24 часов; Е – Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии ГМТ_{вми} и его агрегатов, сформированных в течение 1 и 24 часов, а также после 1 часа дезагрегации; Ж – Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии С-белка и его агрегатов, сформированных в течение ~5 мин и 24 часов; Спектры кругового дихроизма ГМТ_{нми} (З), ГМТ_{вми} (И) и С-белка (К). Спектры представлены для агрегированных и неагрегированных форм белков. Л – ИК-Фурье спектры ГМТ_{нми}; М – ИК-Фурье спектры ГМТ_{вми}. Условия агрегации для Д–М: 0.15 М глицин-КОН при рН 7.0. Измерения проводились при Т=25°C. Воспроизведено из [4, 6, 12, 16, 20] списка работ, опубликованных по теме диссертации.

Исследование связывания агрегатов С-белка и титина с красителем ТТ

Другим распространённым методом исследования амилоидных свойств белковых агрегатов является метод их связывания с ТТ. Мы использовали данный метод для дополнительного подтверждения амилоидной структуры агрегатов ГМТ и С-белка. На рисунке 4 (Д–Ж) представлены графики интенсивности флуоресценции ТТ в присутствии С-белка и титина, а также их агрегированных форм. Показано увеличение интенсивности флуоресценции в присутствии агрегатов всех 3 белков как после 24 часов агрегации, так и после определённых временных интервалов, согласно которым по данным ДРС происходит формирование крупных частиц (агрегатов). Также на графике (Рис. 4 Е) можно наблюдать низкие значения интенсивности флуоресценции ТТ (на уровне молекулярной формы белка) в присутствии агрегатов ГМТ_{вми}, сформированных в течение 1 часа, и после их дезагрегации также в течение 1 часа. Это свидетельствует об отсутствии амилоидных структур в образцах, которые подверглись дезагрегации. Следует также отметить относительно слабое увеличение интенсивности флуоресценции ТТ в присутствии агрегированных форм С-белка (Рис. 4 Ж), но, тем не менее, увеличение флуоресценции присутствует.

2.2. Исследование изменения вторичной структуры титина и С-белка при агрегации

Исследование вторичной структуры титина и С-белка методом КД

На рисунке 4 (З–К) представлены данные КД ГМТ и С-белка, полученные до и после агрегации этих белков в течение 24 часов. Основным результатом данного исследования – это, прежде всего, отсутствие изменений во вторичной структуре при агрегации исследуемых белков.

Содержание α-спиральных участков у ГМТ_{нми} в неагрегированной форме составило 6.1%. Содержание α-спиральных участков у агрегированной формы белка составило 5.5%. Содержание β-складчатых структур у неагрегированной формы белка составило 40.5%, а у агрегированной формы белка – 40.2%. Аналогичные результаты получены для ГМТ_{вми}. Содержание α-спиральных участков в молекулах неагрегированного ГМТ_{нми} составило 6.1%. Содержание α-спиральных участков у агрегированной формы этого белка составило 5%. Содержание β-складчатых структур у неагрегированной формы ГМТ_{вми} составило 41%, а у агрегированной формы белка – 53%. И наконец, у неагрегированной формы С-белка было обнаружено 4.5% α-спиральных участков и 30.7% β-складчатых структур. После агрегации было обнаружено 4.9% α-спиральных участков и 29.7% β-складчатых структур. Оставшиеся проценты скорее всего относятся к участкам неупорядоченности; по полученным нами данным для трех исследуемых белков таковых участков ~50%.

Анализируя полученные данные, можно отметить два ключевых момента: во-первых, процентное соотношение α-спиральных участков и β-складчатых структур в изучаемых белках является сопоставимым, учитывая погрешность; во-вторых, у всех исследуемых белков при агрегации не происходит изменений во вторичной структуре белка. Отсутствие изменений во вторичной структуре при формировании амилоидных агрегатов не свойственно для амилоидных белков, так как для истинных амилоидных белков характерно увеличение β-складчатых структур при агрегации. Поэтому мы провели дополнительное исследование изменений вторичной структуры ГМТ методом ИК-Фурье спектроскопии.

Исследование вторичной структуры титина методом ИК-Фурье спектроскопии

На рисунке 4 (Л, М) представлены данные исследования вторичной структуры ГМТ методом ИК-Фурье спектроскопии. Экспериментальные данные анализировались в соответствии с принципами, описанными в (Yang et. al., 2015). Как и данные кругового дихроизма, данные ИК-Фурье свидетельствуют о том, что вторичная структура белка не изменяется при агрегации. Также стоит отметить относительно высокий процент α -спиральных участков, не свойственный титину. Возможно, некий процент α -спиральных участков вносят структурные элементы головки молекул ГМТ. Также известно, что в структуре молекулы ГМТ имеются 3 участка «Coiled coil».

Анализируя данные, полученные методом ИК-Фурье, можно заключить, что полученные результаты о содержащихся компонентах вторичной структуры немного отличаются от таковых, полученных методом КД. Различия могут быть связаны с особенностями применяемых подходов. В целом, полученные результаты позволяют сделать общий вывод о том, что у исследуемых нами белков во вторичной структуре имеется большое количество ($> 30\%$) неупорядоченной структуры. Но самый главный вывод – это отсутствие изменений во вторичной структуре исследуемых белков при агрегации. Эта важная особенность указывает на уникальный путь агрегации, который характерен для данных белков.

Также следует отметить, что у полученных для ГМТ ИК спектров есть ряд особенностей, которые можно соотнести с некоторыми структурными особенностями амилоидных фибрилл. У двух изоформ ГМТ на графике основной пик амида I' как у агрегированной, так и у неагрегированной форм белка, находится на 1650 см^{-1} и скорее соответствует белкам с преимущественно неупорядоченной и альфа-спиральной структурой, т.е. не содержащим β -слоев (Röhr et al., 2020). Таким образом, ИК-Фурье спектры агрегатов ГМТ не совсем характерны для спектров, полученных для других известных амилоидных белков. Однако на графиках присутствует небольшое плечо полосы амида I', расположенное в диапазоне волновых чисел $1620\text{--}1630\text{ см}^{-1}$ (Рис. 4 Л, М). По имеющимся данным, диапазон волновых чисел $1611\text{--}1630\text{ см}^{-1}$ характерен для амилоидных фибрилл (полоса межмолекулярного β -слоя) (Zandomenighi et al., 2004). Это плечо, хотя и слабо выраженное, присутствует на графике как агрегированной, так и неагрегированной форм двух изоформ ГМТ (Рис. 4 Л, М), что вместе с другими данными, полученными методами рентгеновской дифракции и флуоресценции с ТТ, указывает на вклад небольшого процента содержания β -участков, которые участвуют в образовании межмолекулярных связей.

В литературе также имеются данные о том, что плечо на 1622 см^{-1} полосы амида I' характерно для амилоидоподобных агрегатов ох-АpoA-I (Krishnamoorthy et al., 2018). В нашем случае такое плечо указывает на наличие небольшого количества межмолекулярного β -слоя в агрегированной форме ГМТ, и, что примечательно, в неагрегированной форме белка тоже, т. е. может свидетельствовать о наличии отдельных амилоидных участков этого белка. Это может указывать на наличие межмолекулярных взаимодействий внутри отдельных олигомеров неагрегированной формы белка.

Несмотря на различия в оценке содержания отдельных элементов вторичной структуры, обусловленных природой физических методов (КД и ИК-Фурье), оба подхода позволяют сделать вывод: агрегация ГМТ не сопровождается перестройкой вторичной структуры, что указывает на нетипичный механизм формирования амилоидоподобных агрегатов с сохранением исходной укладки белка.

2.3. Исследование структуры титина и С-белка методом синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (СМУРР)

Исследование титина

Из полученных данных следует, что неагрегированная форма ГМТ_{нми} имеет вытянутую форму (стержнеобразная конформация) ($tg A = -1.2$). Агрегированная форма белка близка к плоской ($tg A = -1.95$). Следовательно, после агрегации стержнеобразная конформация изменилась на плоскую. В отличие от ГМТ_{нми}, неагрегированный ГМТ_{вми} имеет плоскую

форму (пластинчатую конформацию) ($tg A = -2.7$). Скорее всего эти данные отражают наличие олигомеров белка, которых, по данным ДРС, присутствовало до 30% от общего количества всех размерных фракций в образце (Рис. 1 Б (0мин)). Агрегированная форма частиц ГМТ_{ВМИ} также близка к плоской ($tg A = -2.65$).

Исследование С-белка

Для С-белка, ввиду меньших размеров его молекулы и частичной седиментации крупных агрегатов, удалось получить больше информации о конформации молекулярной и агрегированной форм белка, чем для ГМТ. Сначала была оценена молекулярная масса его молекулярной и агрегированной форм путем сравнения с известной массой БСА при экстраполяции кривой рассеяния к нулевому углу рассеяния. Молекулярная масса молекулярного С-белка составляла 150 ± 10 кДа, в то время как агрегированной формы 900 ± 60 кДа. Полученные значения для молекулярной формы С-белка (150 ± 10 кДа) близки к его истинной молекулярной массе (125-134 кДа), а также к значениям, полученным при оценке его электрофоретической подвижности (~ 140 кДа).

Что касается агрегированной формы, то значение 900 кДа, по-видимому, соответствует олигомерам С-белка, состоящим из 6-7 молекул этого белка. Эти данные совпадают с данными, полученными методами ДРС (Рис. 1 Г) и АСМ (Рис. 3 З).

Из полученных данных следует, что неагрегированный С-белок имеет вытянутую форму (палочкообразную конформацию) ($tg A = -1.1$). Агрегированная форма частиц С-белка является сочетанием вытянутой и плоской форм ($tg A = -1.7$). Также для обеих структур был рассчитан радиус поперечного сечения (R_c). R_c можно оценить, построив зависимость $\log(IQ) - Q^2$ (Svergun, 1999). В случае круглого цилиндра $R_c = R/2$, где R — радиус цилиндра. Расчетное значение R_c для неагрегированной формы С-белка составило 30.0 ± 2 Å, в то время как для агрегированной формы этого белка $R_c = 68 \pm 2$ Å.

Дополнительную информацию о структуре белков и агрегатов также можно получить, построив кривую рассеяния в координатах IQ^2 и Q (координаты Кратки). Данные рассеяния неагрегированной формы С-белка, построенные в координатах Кратки, предполагают наличие компактной структуры белка. По его максимуму был вычислен радиус гирации белка (R_g), который составил 30.0 ± 2 Å. Рассчитанное значение R_g агрегированной формы С-белка составило 86 ± 4 Å.

Таким образом, метод СМУРР позволил выявить изменения общей формы и степени компактности частиц при агрегации как ГМТ, так и С-белка. Агрегация ГМТ_{НМИ} сопровождается переходом от вытянутой (стержнеобразной) формы к плоской, тогда как ГМТ_{ВМИ} уже в неагрегированном состоянии обладает плоской конформацией, вероятно, за счёт присутствия олигомеров. У С-белка показано формирование устойчивых олигомерных структур, размеры и масса которых согласуются с данными, полученными методами ДРС и АСМ.

Следует отметить, что метод СМУРР не позволяет делать выводы о вторичной структуре белков, но обеспечивает важную информацию о геометрии и организации агрегатов между отдельными их частицами, что критически важно для понимания механизма агрегации.

2.4. Исследование денатурационной стабильности высокомолекулярной изоформы гладкомышечного титина (ГМТ_{ВМИ}) методом ДСК

Известно, что амилоидные агрегаты являются более стабильными, чем их белки предшественники, поэтому было проведено исследование стабильности, агрегированной и неагрегированной форм титина.

Термическую стабильность агрегатов ГМТ_{ВМИ} определяли методом ДСК. Максимальная температура пика теплопоглощения неагрегированной формы ГМТ_{ВМИ}, T_m , составила 317.7 ± 0.1 °К; значение калориметрической энтальпии перехода, $\Delta H_{cal} = 870 \pm 90$ кДж моль⁻¹. Максимальная температура пика теплопоглощения агрегатов ГМТ_{ВМИ}, T_m , составила

$321.7 \pm 0.1^\circ\text{K}$; значение калориметрической энтальпии перехода, $\Delta H_{\text{cal}} = 1090 \pm 110 \text{ кДж моль}^{-1}$.

На основе определенных температур плавления можно отметить, что стабильность неагрегированной формы ГМТ_{ВМИ} ниже ($T_m = 317.7^\circ\text{K}$), чем стабильность его агрегатов ($T_m = 321.7^\circ\text{K}$). Однако разница максимальной температуры пика теплопоглощения между агрегированной и неагрегированной формами белка не столь существенна как в случае с истинными амилоидными белками. Также разницы практически не наблюдалось между значениями калориметрической энтальпии перехода. Относительно низкие значения температуры плавления белка в исследуемом диапазоне могут быть связаны с относительно высоким содержанием неупорядоченной структуры, что было показано ранее для всех исследуемых нами белков методом ИК-Фурье и КД.

2.5. Изучение особенностей образования олигомеров титина и С-белка

Появление олигомеров на разных стадиях агрегации исследуемых белков заслуживает отдельного внимания, так как это может влиять как на сам процесс агрегации, так и на свойства агрегатов, что может быть связано с токсичностью. Известно, что накопление белковых отложений, как правило, связывают с тяжелой клеточной дегенерацией в местах отложений, при этом точный механизм патогенеза остается малоизученным. В настоящее время предлагается несколько возможных механизмов цитотоксичности, связанной с белковыми отложениями (Uversky, 2010).

Известно, что помимо амилоидных фибрилл белки могут образовывать другие типы агрегатов, такие как растворимые олигомеры и аморфные агрегаты. Аморфные агрегаты обычно образуются быстрее, чем фибриллы. Для их образования не требуется какой-то особой укладки (конформации), многие белки с неупорядоченной структурой и частично развернутые белки формируют аморфные агрегаты. С другой стороны, для фибриллообразования необходимы особые условия, способствующие образованию специфической укладки в амилоидную структуру. Данная специфическая укладка может появляться уже на стадии формирования растворимых олигомеров (Uversky, 2010). Исследуемые нами белки формируют амилоидные аморфные агрегаты. Это расходится с общепринятой научной точкой зрения о том, что амилоидами могут быть только фибриллы белков.

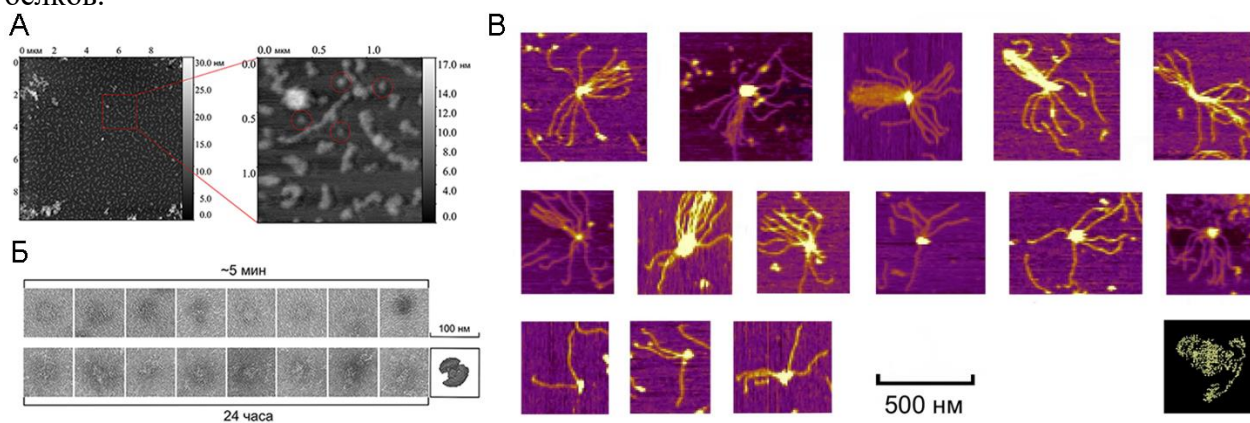


Рис. 5. АСМ и ПЭМ олигомеров С-белка и титина. А – АСМ аморфных агрегатов и олигомеров С-белка, сформированных в течение 24 часов. Отдельно лежащие олигомеры показаны в красных кругах; Б – ПЭМ олигомеров С-белка, сформированных в течение ~5 минут и 24 часа. Справа внизу приведена для сравнения смоделированная структура олигомера С-белка, полученная с помощью программы DAMMIF, на основе данных СМУРР. Размер одного квадрата $100 \times 100 \text{ нм}$. Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин-КОН, $\text{pH } 7.0$, 4°C ; В – АСМ олигомеров ГМТ_{ВМИ}. В основном встречаются олигомеры высокого порядка. Однако в поле зрения обнаружены также димеры, тримеры и тетрамеры (нижний ряд). Шкала 500 нм . Справа внизу в черном секторе приведена для сравнения смоделированная структура олигомера ГМТ_{ВМИ}, полученная с помощью программы DAMMIF, на основе данных СМУРР. Раствор: 0.6 М KCl, 2 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, $\text{pH } 7.0$. Воспроизведено из [16, 17] списка работ, опубликованных по теме диссертации.

Также, согласно распространенной модели, на начальных этапах фибриллообразования мономерный амилоидогенный белок может образовывать одновременно несколько типов олигомерных форм с различной внутренней конформацией. Различные типы олигомеров могут давать начало более крупным агрегатам различной структуры, как фибриллярным, так и аморфным, либо представлять собой относительно стабильные структуры, не запускающие дальнейшую агрегацию (Uversky, 2010). Это соответствует полученным нами результатам. Например, С-белок после формирования крупных аморфных агрегатов в первые 5 минут агрегации в последующем формировал ряд стабильных олигомеров, претерпевающих незначительный рост в течение ~16 часов (Рис. 1 Г). Данные олигомеры не участвовали в формировании крупных агрегатов. С другой стороны, олигомеры ГМТ_{ВМИ} наблюдались нами на начальной стадии агрегации и, скорее всего, участвовали в формировании более крупных агрегатов, а также ускоряли процесс агрегации.

Изучение олигомеров С-белка

Мы исследовали С-белок методом СМУРР и определили, что образуемые данным белком олигомеры имеют молекулярную массу 900 ± 60 кДа и радиус гирации 86 ± 4 Å. При этом в составе больших олигомеров С-белок остается довольно компактным, на что указывает наличие выраженного максимума на графике Кратки. Учитывая молекулярную массу белка, равную ~134 кДа, можно предположить, что олигомер С-белка состоит из ~7 молекул. Из данных, полученных методом ДРС, мы рассчитали количество мономеров в олигомере: их количество составило 10-12 мономеров.

По данным АСМ и ПЭМ препаратов С-белка, олигомеры представляют собой частицы сферической формы с радиусом ~40-50 нм и высотой до 10 нм (Рис. 5 А, Б). Примечательно, что смоделированная трехмерная структура олигомеров С-белка, полученная на основе данных СМУРР, также близка к сферической.

Характеристики полученных олигомеров С-белка близки к таковым, полученным для белка YB-1. Известно, что YB-1 и его гомологи образуют олигомеры массой до 800 кДа (Evdokimova et al., 1995; Tafuri, Wolffe, 1992). Методами электронной и атомно-силовой микроскопии было определено, что адсорбированные на подложку олигомеры имеют округлую форму диаметром 35-40 нм и высотой 9-10 нм (Skabkin et al., 2004).

Изучение олигомеров титина

Отдельного внимания заслуживает анализ структуры олигомеров высокомолекулярной изоформы гладкомышечного титина (ГМТ_{ВМИ}). Способность титина формировать олигомеры разного порядка была впервые показана в 2003 году: методом АСМ было обнаружено, что молекулы титина поперечно-полосатых мышц при понижении ионной силы раствора в течение 10 минут формируют олигомеры (Kellermayer et al., 2003). Начальные условия, в которых находился титин перед формированием олигомеров: 30 mM К-фосфата, 0.6 M KCl, 0.1 mM ЭГТА, 0.3 mM ДТТ, 0.1% NaN₃, 40 мкг/мл леупептина, 20 мкМ E-64 и 0.05% Tween-20, pH 7.0. Условия, в которых титин формировал олигомеры: 25 mM имидазола-HCl, 0.2 M KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM ЭГТА, 0.01% NaN₃, 1 mM ДТТ, 20 мкг/мл леупептина, 10 мкМ E-64, pH 7.4 (Kellermayer et al., 2003). В данных условиях авторы наблюдали отдельно лежащие молекулы титина и олигомеры этого белка. Обнаруженные олигомеры титина были разного порядка: от димеров, тримеров и тетрамеров до более 10 молекул титина в олигомере. Кроме того, у каждого олигомера титина наблюдалась уплотнение в центре – взаимодействующие головки отдельных молекул титина.

Проведенные нами исследования выявили у ГМТ_{ВМИ} наличие олигомеров, по форме и морфологии аналогичные олигомерам титина поперечно-полосатых мышц, описанным выше. В частности, мономеры в олигомерах ГМТ также были связаны головками (Рис. 5 В). Эта головка, вероятно, соответствует участку белка, расположенному в М-линии саркомера – в случае с титином поперечно-полосатых мышц (Kellermayer et al., 2003), или белка плотных тел гладкомышечных клеток – в случае с титином гладких мышц. Из этих наблюдений мы сделали вывод о том, что у ГМТ_{ВМИ} встречаются в основном олигомеры высшего порядка (от

10 до 20 мономеров в олигомере) (Рис. 5 В). Однако мы также наблюдали олигомеры низшего порядка (димеры, тримеры, тетрамеры и т.д.) (Рис. 5 В (нижний ряд)).

Итак, мы обнаружили два отличия олигомеров титина поперечно-полосатых мышц и ГМТ_{ВМИ}. Во-первых, это размеры олигомеров: 500 нм для ГМТ_{ВМИ} и ~1 мкм для титина (Т2) поперечно-полосатых мышц (Kellermayer et al., 2003). По-видимому, это связано с различиями в размерах молекул титина. Вторая и наиболее важная особенность – это условия олигомеризации. Для формирования титином поперечно-полосатых мышц олигомеров требуется снижение ионной силы, в то время как для ГМТ_{ВМИ} этого не требуется. Олигомеры этого белка присутствуют в «колоночном» буфере сразу после очистки с изначально высокой ионной силой (0.6 М КСl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, рН 7.0). Из этого можно сделать вывод о том, что титин гладких мышц больше склонен к агрегации и олигомеризации, чем изоформа этого белка из поперечно-полосатых мышц. Этим объясняется высокая скорость агрегации белка.

Итак, мы наблюдали стабильные олигомеры С-белка, которые не участвовали в образовании крупных агрегатов, а также олигомеры высокомолекулярной изоформы ГМТ с м.м. 1500 кДа, которые участвовали в формировании крупных амилоидных аморфных агрегатов. Однако процесс агрегации и формирование промежуточных продуктов не ясен, поскольку из-за высокой скорости агрегации сложно выявить и проанализировать стадию, на которой происходит сборка крупных агрегатов из более мелких надмолекулярных структур. Для возможного ответа на этот вопрос мы проанализировали ЭМ данные агрегатов низкомолекулярной изоформы ГМТ с м.м. 500 кДа, полученных после 3 часов агрегации. Эта изоформа ГМТ помимо отличий в молекулярной массе имеет более низкую скорость агрегации. В проведенных ранее исследованиях методом динамического светорассеяния мы обнаружили, что ГМТ_{НМИ} после 3 часов агрегации формировал относительно крупные частицы, мономеры и олигомеры (Рис. 1 А).

Из данных, полученных методом ПЭМ, после 3 часов агрегации низкомолекулярной изоформы ГМТ мы наблюдали, что крупный агрегат состоит из отдельных олигомеров (Рис. 31 А диссертации). Таким образом, мы можем предположить, что укрупнение и рост агрегатов ГМТ может происходить за счет олигомеров белка. Олигомеры ГМТ, представляющие собой связанные концами в одной точке молекулы белка с неизменной вторичной структурой, в свою очередь, являются промежуточным продуктом для формирования более крупных аморфных агрегатов.

Таким образом, нами выявлены два принципиально разных сценария образования олигомеров:

1. С-белок формирует стабильные, морфологически компактные олигомеры, не вовлекающиеся в дальнейшую агрегацию;

2. ГМТ, особенно его высокомолекулярная изоформа, образует структурно специфические олигомеры, которые активно участвуют в формировании аморфных агрегатов, вероятно, являясь их основными строительными единицами.

Этот тип агрегации, основанный на слиянии стабильных промежуточных форм при сохранении вторичной структуры, отличает исследуемые мышечные мультидоменные белки от классических амилоидогенных белков и может представлять собой отдельный путь амилоидоподобной самоорганизации белков.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ ДВУХ ТИПОВ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ИЗОФОРМЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО ТИТИНА

3.1. Сравнительное изучение морфологии двух типов агрегатов ГМТ_{НМИ}

Изучение морфологии двух типов агрегатов ГМТ_{НМИ} методом ПЭМ

По данным электронно-микроскопического исследования, агрегаты ГМТ_{НМИ} в двух разных растворах (0.15 М глицин-КОН, рН 7.0 и 200 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0) формировали

аморфные агрегаты, однако агрегаты ГМТ_{нми}, сформированные в растворе, содержащем глицин, представляли из себя аморфные структуры, состоящие из более крупных частиц.

Изучение морфологии двух типов агрегатов ГМТ_{нми} методом АСМ

Согласно данным АСМ, агрегаты титина (Рис. 6 (А–Г)) имели аморфный вид. Агрегаты ГМТ_{нми}, сформированные в растворе, содержащем 200 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0, после 3 часов агрегации имели размер от 30-50 нм до одного микрометра по ширине и до 25 нм по высоте (Рис. 6 А). После 24 часов агрегации наблюдались пористые структуры высотой 8-10 нм (Рис. 6 В). Из полученных результатов можно увидеть, что агрегаты ГМТ_{нми}, сформированные в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0, а также описанные выше в п.1.2. автореферата, представляют собой аморфные агрегаты, состоящие из сферических частиц разного размера (Рис. 6 Б, Г).

Исходя из полученных данных, можно сделать следующие выводы. Во-первых, на ранних стадиях (3 часа) агрегации ГМТ в обоих растворах наблюдается формирование крупных частиц (Рис. 6 А, Б), но после 24 часов агрегации в поле зрения преобладают аморфные агрегаты, состоящие из меньших по размеру частиц, но связанных друг с другом и занимающих большие площади (Рис. 6 В, Г). Второй вывод, он же основной, заключается в том, что размер частиц аморфных агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0, на ранних стадиях агрегации явно меньше (Рис. 6 А), чем размер таковых, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0 (Рис. 6 Б). Это же относится и к агрегатам, сформированным в течение 24 часов (Рис. 6 В, Г). Особенно на изображениях, полученных методом АСМ, видна разница в морфологии между агрегатами ГМТ_{нми}, сформированными в разных условиях.

3.2. Сравнительное изучение обратимости агрегации ГМТ_{нми}

На рисунке 6 (Д, Е) представлены результаты, полученные методом ДРС, демонстрирующие скорость агрегации и способность к дезагрегации агрегатов ГМТ_{нми}, которые были получены в разных условиях. Динамика агрегации была исследована в течение 3 часов. В первую очередь стоит отметить, что не обнаружено существенных различий в размерах частиц и в их процентном соотношении у агрегатов обоих типов. В препаратах неагрегированной формы ГМТ_{нми}, как было уже описано выше в п.1.1. автореферата, наблюдались две размерные фракции частиц, средний гидродинамический радиус (Rh) которых был приблизительно 12-15 нм (доминирующий пик ~90%) и ~45 нм (минорный пик ~10%). Размерная фракция Rh=12-15 нм, скорее всего, соответствует отдельным молекулам титина, тогда как вторая размерная фракция Rh ~45 нм может принадлежать олигомерам белка. После 180 минут агрегации в препаратах белка наблюдалось три фракции частиц. При агрегации ГМТ_{нми} в растворе, содержащем 200 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0, присутствовали размерные фракции с Rh ~20 нм, ~200 нм, ~8000 нм (Рис. 6 Д). При агрегации ГМТ_{нми} в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0, присутствовали размерные фракции с Rh ~20 нм, ~700 нм, ~8000 нм.

Полученные данные для двух типов агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в разных условиях в течение 3 часов агрегации, демонстрируют схожую картину по распределению размерных фракций, за исключением средней размерной фракции. У агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0, данная размерная фракция имела значение Rh=200 нм. У агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0 данная размерная фракция имела значение Rh=700 нм. В обоих условиях присутствовали крупные частицы с Rh=8000 нм, что свидетельствует об одинаковой скорости агрегации, так как это наиболее крупные частицы, которые можно обнаружить данным методом.

При исследовании обратимой агрегации (деагрегации) путём повышения ионной силы раствора (диализ против буферного раствора, содержащего 0.6 М КСl, 30 мМ КН₂РО₄, 1 мМ DTT, 0.1 М NaN₃, рН 7.0) в образцах агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0 была обнаружена их частичная

деагрегация (Рис. 6 Д (пунктирная линия)). В частности, была обнаружена размерная фракция частиц с $R_h \sim 12$ нм, что указывает на появление неагрегированных отдельных молекул этого белка. В случае с другим типом агрегатов (сформированных в растворе, содержащем глицин) подобная фракция частиц не наблюдалась (Рис. 6 Е (пунктирная линия)). Более того, процент частиц с самыми малыми значениями R_h даже после повышения ионной силы раствора в данных образцах уменьшался, а число частиц с большими гидродинамическими радиусами увеличивался, что указывает на необратимость агрегации ГМТ_{нми}, агрегаты которого сформированы в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0.

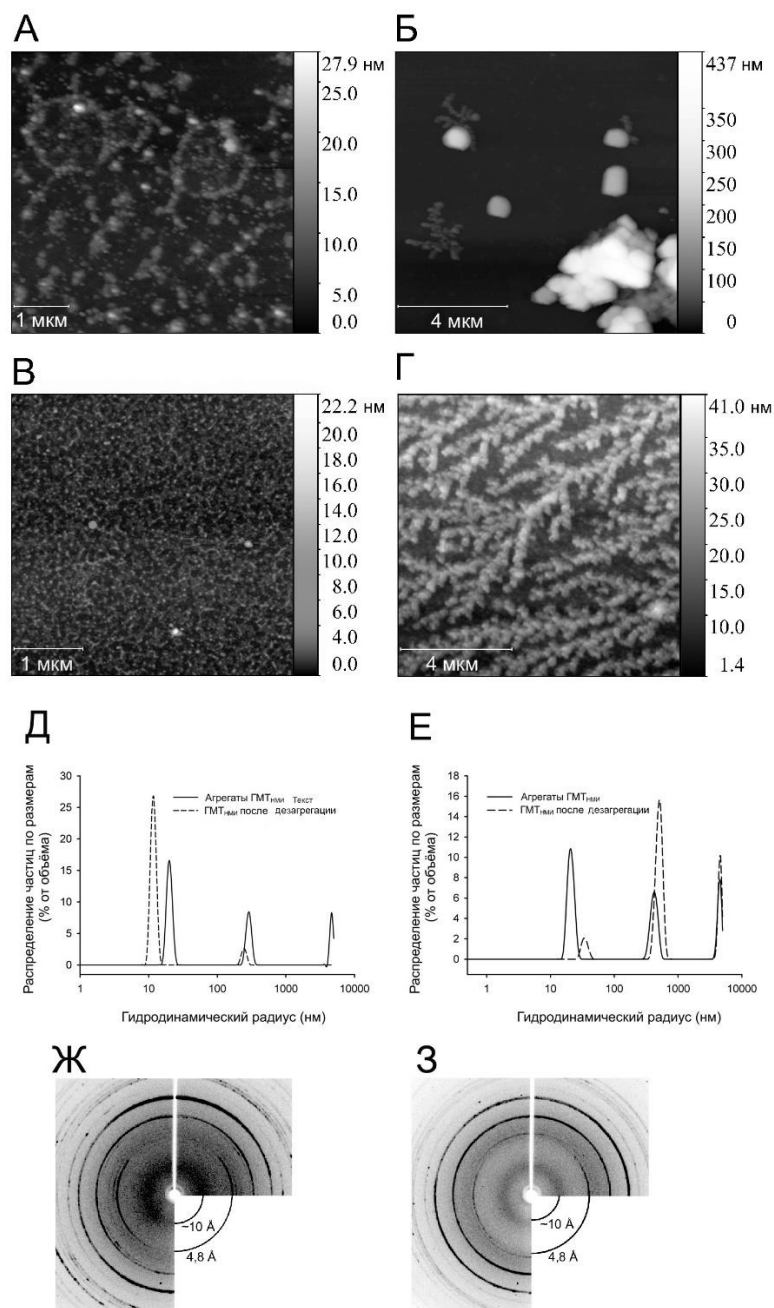


Рис. 6. Аморфные агрегаты ГМТ_{нми}, сформированные в течение 3 часа (А) и через 24 часа (В) агрегации, в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0; Аморфные агрегаты ГМТ_{нми}, сформированные в течение 3 часа (Б) и через 24 часа (Г) агрегации, в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0; Д, Е – Распределение частиц ГМТ_{нми} по размеру через 3 часа агрегации, а также после деагрегации в течение трех часов (белок был предварительно агрегирован также в течение 3 часов). Д – агрегаты ГМТ_{нми}, сформированные в растворе, содержащим 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, а также агрегаты этого белка, после деагрегации, в растворе, содержащем 0.6 М KCl, 30 мМ K₂HPO₄, 1 мМ DTT, 0.1 М NaN₃, pH 7.0 в течение 3 часов; Е – агрегаты ГМТ_{нми}, сформированные в растворе, содержащим 0.15 М глицин-КОН при pH 7.0, а также агрегаты этого

белка, после дезагрегации, в растворе, содержащем 0.6 М KCl, 30 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ DTT, 0.1 М NaN_3 , pH 7.0 в течение 3 часов. Измерения проводились при $T=25^\circ\text{C}$; Ж – Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0; З – Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0. Размытый кольцевой рефлекс $\sim 10 \text{ \AA}$ и выраженный кольцевой рефлекс $\sim 4.8 \text{ \AA}$ подтверждают наличие кросс- β -структуры. Воспроизведено из [6] списка работ, опубликованных по теме диссертации.

Таким образом, помимо различий в морфологии, выявленных методами АСМ и ПЭМ, была выявлена другая особенность агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в двух разных растворах: агрегаты ГМТ_{нми}, сформированные в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, дезагрегировали при повышении ионной силы.

3.3. Изучение амилоидной природы двух типов агрегатов ГМТ_{нми}

Исследование агрегатов ГМТ_{нми} методом рентгеновской дифракции

При помощи дифракции рентгеновских лучей были выявлены следующие рефлексы для агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0: диффузный 8.19-12.69 $\text{\AA}$ (среднее значение которого равно 9.52 $\text{\AA}$) и 4.8 $\text{\AA}$ (Рис. 6 Ж); для агрегатов белка, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0, этим рефлексам соответствовали значения: 8.24-11.68 $\text{\AA}$ (ср. зн. =9.31 $\text{\AA}$) и 4.83 $\text{\AA}$ (Рис. 6 З). Полученные рефлексы соответствуют четвертичной кросс- β структуре, характерной для амилоидных агрегатов.

Исследование связывания агрегатов ГМТ_{нми} с красителем ТТ

В ходе эксперимента мы проводили измерения интенсивности флуоресценции ТТ в присутствии агрегатов титина обоих типов после 3 и 24 часов агрегации (Рис. 7 А). Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, в течение 3 и 24 часов практически не увеличивалась по сравнению с ее интенсивностью в присутствии молекулярной формы титина (Рис. 7 А) и была значительно ниже интенсивности флуоресценции агрегатов этого белка, сформированных в других условиях. Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии агрегатов титина, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0, в течение 3 и 24 часов была значительно выше, чем интенсивность флуоресценции красителя в присутствии молекулярной формы титина (Рис. 7 А).

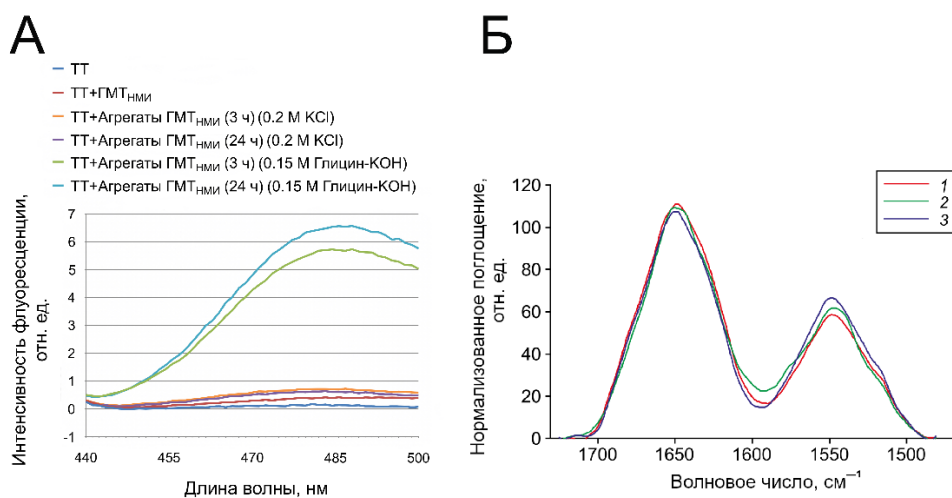


Рис. 7. А – Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии ГМТ_{нми} и агрегатов этого белка, сформированных в течение 3 и 24 часов в растворах, содержащих 0.15 М глицин-КОН при pH 7.0 и 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0. Измерения проводились при $T=25^\circ\text{C}$; Б – ИК-Фурье спектры ГМТ_{нми} (1) и его агрегатов, сформированных в растворах, содержащих 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0 (2) и 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0 (3). Воспроизведено из [6, 20] списка работ, опубликованных по теме диссертации.

Таким образом, отсутствие связывания ТТ с амилоидными агрегатами ГМТ_{нми}, сформированными в растворе, содержащем 200 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0, является еще одним отличием этого типа агрегатов от агрегатов ГМТ_{нми}, сформированных в растворе, содержащем глицин.

3.4. Изучение вторичной структуры двух типов агрегатов ГМТ_{нми}

Для исследования вторичной структуры разных типов агрегатов ГМТ_{нми} мы использовали ИК-Фурье спектроскопию. На рисунке 7 (Б) представлены данные ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье. Из полученных данных видно, что у гладкомышечного титина в процессе формирования двух типов амилоидных агрегатов не происходит изменений во вторичной структуре.

3.5. Изучение структуры двух типов агрегатов ГМТ_{нми} методом СМУРР

СМУРР был использован для получения информации о конформации двух типов агрегатов ГМТ_{нми}. Из полученных нами данных, и как уже было описано ранее, следует, что молекула ГМТ_{нми} имеет вытянутую форму (палочкообразную конформацию) ($tg A = -1,2$). Форма частиц агрегатов ГМТ_{нми} близка к пластинчатой, как у полученных в растворе, содержащем 200 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.5, ($tg A = -1.86$), так и в растворе, содержащем 0.15 М Глицин-КОН, рН 7.5 ($tg A = -1.95$). Значения тангенса угла наклона кривой рентгеновского рассеяния, полученные для обоих типов агрегата, являются близкими. Это свидетельствует о том, что несмотря на разную морфологию агрегатов, полученных в разных условиях, данные агрегаты состоят из одинаковых частиц. Соответственно, различия в морфологии обусловлены особой организацией и упаковкой уже сформированных частиц.

Таким образом, объединив данные, полученные разными структурными методами (СМУРР, ИК-Фурье, рентгеновской дифракции, АСМ, ПЭМ), можно предположить наличие неких промежуточных стабильных надмолекулярных структур, которые формируются, судя по данным ДРС, в течение первых 3 часов агрегации – структур, имеющих четвертичную кросс-β-структуру.

Итак, результаты наших исследований показывают, что низкомолекулярная изоформа гладкомышечного титина формирует *in vitro* разные по морфологии аморфные агрегаты, отличающиеся по способности связывать краситель ТТ и способности к дезагрегации. Оба типа агрегатов по имеющимся данным имеют четвертичную кросс β-структуру и одинаковую вторичную структуру.

ГЛАВА 4. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ТИТИНА И С-БЕЛКА

4.1. Идентификация рефлексов, полученных методом рентгеновской дифракции

Известно, что основное свойство всех амилоидных агрегатов – это наличие преобладающей четвертичной кросс-β структуры (Sunde et al., 1997; Nelson, Eisenberg, 2006). Наличие подобной структуры определяется методом рентгеновской дифракции. На рентгенограммах препаратов частично выровненных (ориентированных) амилоидных фибрилл регистрируются два дифракционных рефлекса, расположенные на взаимно перпендикулярных осях (Makin, Serpell, 2005; Astbury et al., 1935; Eanes, Glenner, 1968; Jahn et al., 2010). Дифракционные рефлексы, расположенные вертикально на дифракционной картине (меридиональные рефлексы), соответствуют периоду 4.7-4.8 Å. Этот период указывает на то, что полипептидные цепи расположены перпендикулярно оси фибриллы, и расстояние между ними 4.7-4.8 Å. Дифракционные рефлексы, расположенные по горизонтали дифракционной картины (экваториальные рефлексы), соответствуют периоду 10-11 Å. Данные рефлексы указывают на то, что полипептидные цепи организованы в β-листы,

которые находятся на расстоянии 10-11 Å друг от друга (Eisenberg, Jucker, 2012; Wille et al., 2009).

В случае менее ориентированных фибрилл оба типа рефлексов размываются и отображаются на дифракционной картинке в виде кольца (Morris, Serpell, 2012). Поэтому при исследовании амилоидных структур методом рентгеновской дифракции проводят специальную подготовку образца, позволяющую получить хорошо ориентированные фибриллы. В нашем исследовании структуры агрегатов титина и С-белка методом рентгеновской дифракции применялась именно такая техника приготовления образца. В частности, каплю концентрированного препарата белка в буферном растворе помещали между двумя стеклянными палочками, покрытыми парафином и находящимися на расстоянии 3-5 мм. При высыхании капли белок ориентировался в одном направлении, вытягиваясь между двумя стеклянными палочками, превращаясь в тонкую нить. Подобная техника приготовления образца описана в работе (Morris, Serpell, 2012) и использовалась нами. Далее образец помещали в пучок рентгеновских лучей. Мы получили ряд рефлексов, которые отображались на дифракционной картинке в виде колец. Присутствие других «неамилоидных» рефлексов потребовало проведения дополнительных исследований.

Итак, помимо вышеуказанных «амилоидных» рефлексов ($\sim 8-12$ Å и ~ 4.8 Å), были обнаружены и другие (Рис. 6 Ж, З, также см. Рис. 4), которые не удалось идентифицировать. Однако проведенные дополнительные исследования образцов используемых буферных растворов методом рентгеновской дифракции указывают на принадлежность выявленных рефлексов к структуре ГМТ.

4.2. Особенность основных «амилоидных» рефлексов, полученных для агрегатов ГМТ_{нми} и других исследованных белков

Другое наше затруднение было связано с интерпретацией основных «амилоидных» рефлексов на дифракционной диаграмме агрегатов исследуемых белков. Сначала проанализируем данные, полученные для низкомолекулярной изоформы гладкомышечного титина. Первый дифракционный рефлекс (4.8 Å) у обоих образцов ГМТ_{нми} располагался не по вертикали дифракционной картины (меридиональное направление), а по горизонтали (экваториальное направление) (Рис 6 Ж, З). Исходя из этого, мы сделали предположение, что β -участки в агрегатах ГМТ_{нми} располагаются не перпендикулярно оси фибриллы, как это описано для других амилоидных белков, а – параллельно. Второй рефлекс ($\sim 8-12$ Å), характеризующий расстояние между β -листами, был диффузным и кольцевым. Мы предполагаем, что расстояние между β -листами может варьировать, а сами β -листы не являются строго ориентированными по одной из осей. Здесь следует отметить, что подобное явление, когда один из рефлексов, описанных для кросс- β структуры, является кольцевым, а второй не является таковым, в литературе не встречалось. Полученные данные указывают на уникальность и сложность объекта нашего исследования – мультидоменных мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов.

В случае с агрегатами ГМТ_{вми} и С-белка, оба амилоидных рефлекса являются кольцевыми (Рис. 4 Б–Г). Наличие кольцевых рефлексов $4.6-4.8$ Å у агрегатов ГМТ_{вми} и С-белка предполагает, что β -участки ориентированы под разными углами относительно оси фибриллы. Несмотря на то, что среди множества исследователей распространена точка зрения о том, что аморфные агрегаты не могут быть амилоидными, полученные нами данные говорят об обратном. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок образуют амилоидные аморфные агрегаты с уникальной структурой.

4.3. Расчет идентичности аминокислотной последовательности и неструктурированных участков ГМТ и С-белка

Расчет идентичности аминокислотной последовательности между парами доменов титина и С-белка

Как известно, устойчивость или склонность белка к агрегации связана с первичной структурой (Berrymann et al., 2011; Scherzer-Attali et al., 2012; Barz, Urbanc, 2014; Ow, Dunstan, 2014). Для выявления участков с большой идентичностью аминокислотной последовательности, которые, по имеющимся данным, имеют повышенную склонность к агрегации (Borgia et. al., 2015), мы рассчитали идентичность в аминокислотной последовательности между соседними парами доменов титина и С-белка. Для расчетов были выбраны куриный титин (UniProtKB – A6BM71_CHICK) и два паралога С-белка скелетных мышц человека: «медленный» паралог (UniProtKB – Q00872_MYPC1_HUMAN) и «быстрый» паралог (UniProtKB – Q14324_MYPC2_HUMAN).

Расчеты, проведенные для титина с помощью программы BLAST, показали, что средняя идентичность в последовательности между соседними доменами FnIII не превышает $33 \pm 7\%$; между соседними доменами Ig – $20 \pm 11\%$, что является относительно низким показателем. Однако в двух случаях наблюдались домены с идентичностью выше 50%.

Результаты идентичности аминокислотной последовательности между доменами, рассчитанные для двух паралогов С-белка, показали, что средняя идентичность между соседними доменами в обоих паралогах не превышает 26%, что также является относительно низким показателем. Максимальная идентичность 30% зарегистрирована между доменами Fn1 и Fn2 для «медленного» паралога С-белка.

Дополнительно мы подсчитали количество амилоидогенных сегментов в случайно выбранных доменах фрагмента титина курицы, предсказанное с помощью программы FoldAmyloid (три Ig-подобных и три FnIII-подобных доменов). В каждом из подсчитанных доменов есть как минимум два амилоидогенных сегмента. Ig-подобный (I10) домен имеет пять таких сегментов (Bobylov et al., 2023). Эти данные свидетельствуют о высокой потенциальной склонности титина к амилоидной агрегации, присущей его отдельным доменам.

Расчет неупорядоченных участков в молекуле титина и С-белка

По данным КД и ИК-Фурье содержание неупорядоченных участков у С-белка и ГМТ составляет более 50%. Мы воспользовались математическим подходом прогнозирования неупорядоченных участков, чтобы оценить распределение неупорядоченных областей на отдельных участках молекулы белка. Наличие неупорядоченной структуры у ГМТ было выявлено при анализе аминокислотной последовательности UniProtKB – A6BM71_CHICK с помощью специализированной математической программы IsUnstruct (Lobanov et. al., 2013; Lobanov, Galzitskaya, 2011). По нашим подсчетам, средняя неупорядоченность для фрагмента титина PRK12323 составила 90%. Для Ig-подобных доменов в среднем также было предсказано 90% неупорядоченности, в то время как для FnIII-подобных доменов было предсказано 30% неупорядоченности. Кроме того, у участков белка, обозначенных как «попе», было предсказано в среднем 55% неупорядоченности. Аналогичные данные получены и для С-белка, свидетельствующие о значительном присутствии неупорядоченной структуры в молекуле этого белка.

Анализируя полученные данные, можно сделать основной вывод, что достаточно большой процент в молекулах исследуемых белков, особенно титина, предсказывается как неупорядоченная структура. В целом, неструктурированные области равномерно распределены вдоль всей молекулы исследуемых белков. Это, скорее всего, является определённым компонентом стабильности и, по-видимому, играет определённую роль в формировании амилоидных агрегатов с описанными нами структурными особенностями.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ГМТ И С-БЕЛКА НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

5.1. Изучение цитотоксического действия амилоидных агрегатов титина и С-белка

Накопление белковых отложений в виде амилоидных фибрилл, как правило, связывают с тяжелой клеточной дегенерацией в местах данных отложений. При этом точный механизм патогенеза амилоидозов не известен. Главный вопрос состоит в том, являются ли амилоиды причиной клеточной дегенерации или же просто представляют собой видимые побочные продукты процесса разрушения клеток. Тем не менее, установлено, что явления неправильного сворачивания/агрегации белка и клеточной дегенерации взаимосвязаны. В настоящее время предлагается несколько возможных механизмов цитотоксичности, связанной с белковыми отложениями (Uversky, 2010). И наиболее токсичными для клеток являются олигомеры. Поскольку исследуемые белки являются амилоидными, была поставлена задача выяснить токсический эффект амилоидных агрегатов ГМТ и С-белка на клетки. Отдельный интерес представляло исследование цитотоксичности стабильных олигомеров, которые образовывал С-белок. Для исследования цитотоксичности была выбрана культура гладкомышечных клеток. В качестве контроля был выбран фибриллярный актин.

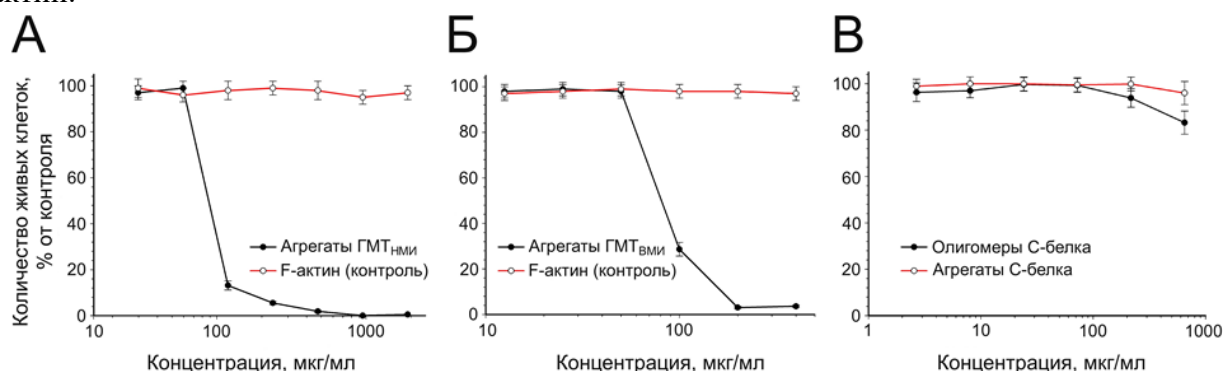


Рис. 8. Исследование цитотоксичности агрегатов ГМТ и С-белка на ГМК аорты крысы. А – Токсическое действие амилоидных агрегатов ГМТ_{нми}, IC₅₀ 70 мкг/мл; Б – Токсическое действие амилоидных агрегатов ГМТ_{вми}, IC₅₀ 70 мкг/мл; В – Влияние агрегатов С-белка (красная линия) и олигомеров С-белка (черная линия). Время инкубации 72 ч. Ф-актин использовали в качестве контроля. Воспроизведено из [4, 12, 13] списка работ, опубликованных по теме диссертации.

На рисунке 8 представлены данные о цитотоксическом действии агрегатов ГМТ и С-белка на культуру гладкомышечных клеток аорты крысы через 72 ч. Стоит отметить, что до 72 часов никаких негативных/токсических эффектов не наблюдалось. Через 72 часа наблюдался негативный эффект у агрегатов ГМТ (Рис. 8 А, Б). В частности, выживаемость 50% клеток (IC₅₀) в присутствии агрегатов обеих изоформ ГМТ наблюдалась при концентрации белка 70 мкг/мл. Гибели клеток в присутствии агрегатов при более низких концентрациях не наблюдалось.

Вопреки ожиданиям, гибель клеток не наблюдалось в присутствии как агрегатов, так и олигомеров С-белка (Рис. 8 В).

Таким образом, агрегаты ГМТ оказывали токсическое действие на гладкомышечные клетки в отличие от агрегатов и олигомеров С-белка. Важно отметить, что гибель клеток наблюдалось только через 72 часа присутствия агрегатов ГМТ в культуре.

5.2. Изучение влияния амилоидных агрегатов ГМТ на актиновый цитоскелет гладкомышечных клеток

Влияние агрегатов титина на актиновый цитоскелет

У гладкомышечных клеток аорты крысы через 48 ч инкубации с агрегатами ГМТ наблюдали дезорганизацию актинового цитоскелета и морфологические изменения (ламеллоподии, стрессовые волокна), указывающие на нарушение клеточной адгезии. Ф-актин в контрольных условиях такого эффекта не вызывал.

Морфология поверхности, покрытой агрегатами

АСМ показал, что агрегаты ГМТ формируют наноструктурированный рельеф с высокой шероховатостью (RMS 2.7-4.9 нм), который может препятствовать клеточной адгезии, аналогично описанным в литературе антиадгезивным поверхностям.

Адгезия клеток на поверхности с агрегатами титина

Фибробласты, посеянные на поверхность, покрытую агрегатами ГМТ, демонстрировали снижение прикрепления и нарушения в организации цитоскелета. Наблюдалась морфологическая перестройка, характерная для клеток, теряющих прочный контакт с подложкой.

Таким образом, впервые было показано, что негативное действие амилоидных агрегатов гладкомышечного титина опосредовано не прямым повреждением клеток, а нарушением клеточной адгезии, что обусловлено наноструктурой поверхности, формируемой агрегатами. При этом агрегаты и олигомеры С-белка в исследованных условиях не проявляли цитотоксичности.

Основной вывод заключается в том, что амилоидные агрегаты данных белков не обладают токсичностью в отношении различных типов клеток, что может свидетельствовать о потенциальной функциональной, а не патологической роли таких агрегатов.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

ГЛАВА 6. ОСОБЕННОСТЬ ДИНАМИКИ АГРЕГАЦИИ, МОРФОЛОГИИ И СТРУКТУРЫ АГРЕГАТОВ ГМТ И С-БЕЛКА

По нашим результатам из мышечной ткани желудка курицы были выделены 2 изоформы ГМТ с молекулярной массой ~500 кДа (ГМТ_{НМИ}) и ~1200-1500 кДа (ГМТ_{ВМИ}). В свою очередь из скелетных мышц кролика был изолирован «быстрый» паралог С-белка с м.м. ~134 кДа.

Методом ДРС было обнаружено, что при снижении ионной силы гладкомышечный титин и С-белок образовывали крупные агрегаты в течение относительно коротких интервалов времени: в течение первых 5 минут – при агрегации С-белка, в течение 60 минут – при агрегации ГМТ_{НМИ} (Рис. 1 А) и 20 минут – при агрегации ГМТ_{ВМИ} (Рис. 1 Б). Скорость агрегации исследуемых мышечных белков была намного выше, чем у большинства известных амилоидных белков. Например, зрелые фибриллы Гелсолина (AGel) образуются через 48 часов (Arya et. al., 2014), транстиретина (TTRwt) – от 3 суток до недели и более (Ferreira et. al., 2021), Аβ-пептида (1-40) – через 24-48 часов (Kalita et. al., 2022). И, что особенно важно, в динамике агрегации гладкомышечного титина и С-белка отсутствует так называемый «лаг»-период. Одной из возможных причин отсутствия «лаг-периода» является присутствие в белковых препаратах титина и С-белка олигомеров, которые, как известно, могут служить затравкой для быстрой инициации процесса агрегации (Kumar, Walter, 2011). В таком случае процесс агрегации сразу начинается с фазы элонгации/фазы роста, минуя фазу так называемого «лаг-периода»/задержки, что было показано, например, при агрегации Аβ-пептида (Kumar, Walter, 2011). В наших экспериментах отсутствие «лаг-периода» при агрегации титина и С-белка подтверждается как данными ДРС, так и данными, полученными методами АСМ, ПЭМ (Рис. 2, 3).

Таким образом, первой особенностью исследуемых нами мультидоменных мышечных белков является их высокая скорость агрегации.

Следующей особенностью агрегации исследуемых нами мышечных белков является способность их амилоидных агрегатов дезагрегировать при увеличении ионной силы раствора. В частности, способность к обратимой агрегации была обнаружена у агрегатов ГМТ_{ВМИ}, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН при pH 7.0 (Рис. 1 В), а также у агрегатов ГМТ_{НМИ}, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0 (Рис. 6 Д). Из литературы известно, что образование патологических амилоидных структур не является обратимым процессом (Stefani, Dobson, 2003; Ross, Poirier, 2004; Mukherjee et al., 2015). Однако обратимая агрегация была показана для некоторых функциональных амилоидных агрегатов, например, для агрегатов амилоидных телец (А-телец), которые образуются в ответ на стресс окружающей среды в клетках человека (Lacroix et al., 2021), а также для других функциональных амилоидных агрегатов (Woodruff et al., 2018; Cereghetti et al., 2018). Принято считать, что для функциональных амилоидных агрегатов в процессе эволюции сформированы механизмы, регулирующие процессы сборки и разборки амилоидов. Однако эти механизмы остаются неизвестными.

Опираясь на полученные данные, и, в том числе, данные олигомеризации ГМТ, можно предположить, что при агрегации титина и С-белка межмолекулярные связи с последующим образованием кросс-β структуры могут возникнуть между отдельными молекулами этих белков уже внутри олигомера (Рис. 9 А, Б). В подтверждение того, что подобный механизм амилоидной агрегации исследованных нами мышечных белков имеет место быть, можно привести данные о частичном анфолдинге доменов титина, не требующем затрат энергии (Rivas-Pardo et al., 2016; Eckels et al., 2019).

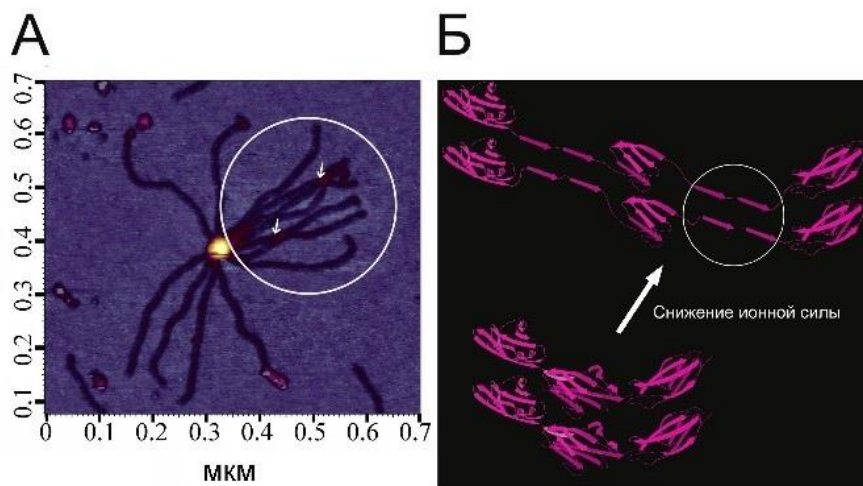


Рис. 9. А – АСМ олигомера ГМТ_{ВМИ}. Внутри белого круга показаны отдельно лежащие молекулы титина, которые расположены близко друг к другу. Белыми стрелками отмечены участки молекул белка, которые наиболее близко прилегают друг к другу. Важно отметить, олигомеры находятся в растворе с высокой ионной силой (0.6 М KCl). Б – Схематичное представление формирования межмолекулярных связей между частично развернутыми доменами двух расположенных рядом молекул белка. На схеме частичный анфолдинг представлен для среднего домена. Внутри белого круга схематично показана вероятная структура, напоминающая кросс-β, которая возможна для агрегатов ГМТ. Схема представлена на примере трех доменов титина (двух иммуноглобулин-подобных и одного фибронектин III-подобного), расположенных в А-диске саркомера. Источник: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8WZ42>. Воспроизведено из [18] списка работ, опубликованных по теме диссертации.

В поддержку сделанного предположения можно привести наши данные, полученные методом СМУРР, для двух морфологически различающихся типов агрегатов ГМТ_{НМИ}. Наши данные, демонстрирующие отсутствие различий в структуре частиц, входящих в состав агрегатов титина, сформированных в разных условиях, свидетельствуют о том, что в основе обоих типов агрегатов этого белка лежат структуры с одинаковой укладкой полипептидных цепей. На основании имеющихся данных можно сделать предположение, что в основе формирования обоих типов агрегатов титина лежат стабильные надмолекулярные структуры

с определенной укладкой, но которые имеют четвертичную кросс- β -структуру. Подобные надмолекулярные структуры, по всей вероятности, лежат в основе агрегации и С-белка. Об этом свидетельствуют данные АСМ, на которых можно наблюдать, что более крупные структуры состоят из отдельных частиц, предположительно олигомеров (Рис. 3 Ж, 3 и Рис. 5 А, Б). Однако доказательства образования межмолекулярной «амилоидной» связи как в литературе, так и по нашим данным, получены именно для титина. Это связано в первую очередь с большими размерами данного белка, что позволило нам визуально оценить взаимодействие молекул белка в процессе агрегации. Также, большие размеры белка практически исключают его полный или существенный анфолдинг, вследствие чего частичная агрегация белка становится единственно верным исходом, объясняющим наличие амилоидной структуры при отсутствии изменений во вторичной структуре. Полученные нами результаты по агрегации гладкомышечного титина позволяют предположить, что при снижении ионной силы на начальной стадии агрегации происходит образование межмолекулярной связи по типу амилоидной между частично открытыми доменами рядом расположенных молекул белка в олигомере, как это показано на рисунке 9 (Б).

Подводя итог вышеизложенному, учитывая полученные нами данные и данные, имеющиеся в литературе, можно сделать предположение, что формирование амилоидных структур вероятно происходит на этапе олигомеризации титина и С-белка. Учитывая близость молекул титина в I-зоне саркомера сердечной и скелетных мышц, а также взаимодействие титина с С-белком в А-зоне, нельзя исключить формирование амилоидоподобных структур, образуемых этими белками, в поперечно-полосатых мышцах *in vivo*. Аналогичные структуры, образованные молекулами титина или других белков толстых и тонких нитей, могут формироваться и в гладкой мышце.

Стоит обсудить еще одну особенность амилоидной агрегации гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка – это формирование этими белками аморфных, а не фибриллярных амилоидных агрегатов. Предложенный выше механизм «частичной амилоидной агрегации» титина и С-белка, когда межмолекулярные связи возникают только между отдельными участками молекул этих белков, вполне объясняет невозможность формирования высокоупорядоченных амилоидных фибрилл. До сих пор многие исследователи считают, что амилоидными могут быть только высокоупорядоченные фибриллы, а не аморфные агрегаты, которые являются продуктом неправильного сворачивания белка «вне пути» (Adamcik, Mezzenga, 2018). Однако в литературе есть данные о том, что некоторые белки, так же как титин и С-белок, тоже формируют амилоидные аморфные агрегаты. И можно обнаружить морфологическое сходство между аморфными агрегатами гладкомышечного титина и С-белка и агрегатами других белков. В научной литературе известно как минимум семь белков (куриный лизоцим, бычий инсулин, человеческий транстиретин, человеческий α -синуклеин, бычий сывороточный альбумин, миоглобин сердца лошади, а также β -лактоглобулин) (Donato et al., 2011; Pal et al., 2020; Khan et al., 2022), образующих сферические аморфные агрегаты с подтвержденной амилоидной природой (Surroca et al., 2002); агрегаты, подобные тем, что формируют исследованные нами мышечные белки. Таким образом, полученные нами результаты и литературные данные свидетельствуют о том, что образование морфологически сходных белковых аморфных агрегатов вполне возможно, и что эта сборка не зависит от аминокислотной последовательности белков (de Jongh et al., 2001; Krebs et al., 2005).

В работах, посвященных исследованию агрегации β -лактоглобулина, авторы приходят к выводу о существовании стабильных β -структур различной регулярности, лежащих в основе формирования агрегатов различной морфологии этого белка. В зависимости от условий агрегации меняется их морфология – от высокоупорядоченных амилоидных фибрилл с высоким суммарным зарядом до коротких амилоидных фибрилл и аморфных агрегатов (сферических частиц с низким общим зарядом) (Krebs et al., 2009). Авторы предполагают, что при формировании сферических агрегатов β -лактоглобулина происходит частичное разворачивание молекулы белка (Roefs, de Kruif, 1994; Ikeda, Nishinari, 2001; Bauer et al., 2000;

Alting et al., 2002; Surroca et al., 2002; Visschers, De Jongh, 2005). Аналогичное предположение высказываем и мы, проведя комплексное исследование процесса агрегации титина и С-белка.

Обсуждая морфологическое сходство и особенности агрегации, исследуемых нами, а также других белков, необходимо обратить внимание на следующее. В наших исследованиях мы показали, что агрегаты ГМТ_{нми}, сформированные в течение 24 часов, по данным АСМ представляли собой разветвленные цепи, состоящие из сферических частиц диаметром ~300-500 нм и высотой до 35-40 нм, и расположенных по всему полю зрения (Рис. 3 Б). Из литературных данных известно, что подобные ветвящиеся структуры обнаружены у белка Pmel17, который формирует функциональные амилоиды (Dogra et al., 2017). Наблюдается поразительное морфологическое сходство между этими агрегатами, сформированными из фрагмента функционального амилоидного белка Pmel17, и агрегатами, сформированными ГМТ_{нми}. Эти данные позволяют говорить о схожих механизмах агрегации этих двух белков.

Итак, по нашим данным гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок формируют только аморфные амилоидные агрегаты. Следует отметить, что подобное свойство характерно и для отдельных доменов этих белков. Исследования, проведенные для Ig-подобного I27 домена титина, показали, что данный домен формирует *in vitro* амилоидные аморфные агрегаты (Borgia et al., 2013). Причем, как утверждают авторы работы, агрегаты данного домена титина остаются аморфными в течение длительного времени и не проявляют никаких признаков перестройки в зрелые фибриллы даже через четыре месяца инкубации (Borgia et al., 2013). Объяснение, почему происходит образование аморфных агрегатов, а не линейных фибрилл в процессе агрегации исследованных белков, мы получили, проведя биоинформатический анализ. Анализ размера ядер нуклеации, проведенный с использованием данных агрегационной кинетики, полученный для 27-го Ig домена (Wright et al., 2005) показал, что размер ядра первичной нуклеации для этого домена составил 2.4 ± 0.5 и он был больше, чем размер ядра вторичной нуклеации (1.5 ± 0.4). Эти данные означают, что агрегация как отдельного домена, так и, возможно, всего белка титина может идти не по линейному механизму, как это происходит в случае сборки неамилоидных фибрилл актина (Sept, McCammon, 2001), а по другому механизму, где имеется сценарий ветвления с образованием ядер вторичной нуклеации на поверхности фибрилл.

Отдельные моменты, учитывающие особенности структуры амилоидных агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка, следует обсудить, обратившись к данным рентгеновской дифракции. Как уже было описано ранее, амилоидная четвертичная кросс- β структура характеризуется на рентгенограммах двумя рефlekсами с периодами ~4.7 Å, и 9-12 Å. На препаратах частично выровненных амилоидных фибрилл рентгеновская дифракция дает характерную картину, демонстрирующую два дифракционных рефlekса в меридиональном и экваториальном направлениях (соответственно 4.6-4.8 Å и 9-12 Å). Что характерно, в образцах амилоидных сферических частиц β -лактоглобулина (Krebs et al., 2009) и образцах амилоидных агрегатов исследуемых нами мышечных белков эти два рефlekса выглядят как изотропные диффузные кольца (Рис 4 А-Г). Авторы, исследовавшие амилоидную природу β -лактоглобулина, заключили, что, учитывая сферическую природу частиц, невозможно получить высоко ориентированные образцы, рентгенограммы которых демонстрировали бы четкие дифракционные рефlekсы (Krebs et al., 2009). Мы пришли к такому же выводу, исследуя методом рентгеновской дифракции агрегаты гладкомышечного титина и С-белка. Полученные данные указывают на то, что амилоидные аморфные агрегаты β -лактоглобулина имеют схожую структуру с амилоидными агрегатами исследуемых нами мышечных белков.

В порядке обсуждения этих результатов, следует отметить следующее. Известно, что Ig- и FnIII-подобные домены титина и С-белка представляют собой β -сэндвич-домены, характеризующиеся двумя противоположными антипараллельными β -листами (Clarke et al. 1999; Erickson, 1994). В случае полного или частичного раскрытия домена, как это показано на рисунке 9 Б, на уровне отдельных молекул белка или олигомеров (Рис. 9 А), может происходить образование межмолекулярных связей в белке и формирование амилоидоподобной структуры. Далее олигомеры могут объединяться в более крупные

структуры. Таким образом, можно предположить, что в препаратах исследуемых нами мышечных белков такие амилоидогенные участки находятся под разными углами к рентгеновскому пучку, что приводит к появлению диффузного рефлекса на дифракционной картине. Одна из возможных структур для титина при его агрегации описана в работе (Borgia et al., 2015). При исследовании *in vitro* неправильного сворачивания двух иммуноглобулин-подобных (Ig27 и Ig28) доменов титина методом молекулярной динамики вышеуказанными авторами были описаны группы конформаций, получившие название «внутримолекулярный амилоид». Исходя из полученных нами данных, можно сделать вывод, что агрегированные гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок имеют четвертичную кросс- β структуру. А если учитывать данные кругового дихроизма об отсутствии изменений во вторичной структуре мышечных белков при их агрегации, можно предположить, что в их агрегатах присутствуют лишь участки кросс- β структуры. Авторы исследования сферических частиц β -лактоглобулина также пришли к выводу о присутствии лишь участков с кросс- β структурой в молекуле белка (Oboroceanu et al., 2010). По их мнению, взятые вместе данные показывают, что сферические частицы состоят, по крайней мере частично, из амилоидоподобных β -слоев, которые достаточно короткие, плотно упакованные, что приводит к образованию наблюдаемых сферических частиц. Следовательно, β -лактоглобулин имеет высокую склонность к сборке именно в агрегаты с кросс β -подобной структурой. Предполагается, что эта структурная особенность позволяет белку формировать разные типы агрегатов, в том числе и такие, которые не имеют фибриллярной морфологии (Oboroceanu et al., 2010). Таким образом, полученные нами данные об амилоидной агрегации исследуемых мышечных белков, а также литературные данные об амилоидной агрегации других белков свидетельствуют о существовании амилоидных аморфных агрегатов с наличием участков, имеющих кросс- β структуру.

Обсуждая возможную функциональную или патологическую роль агрегации титина и С-белка в мышечных клетках, следует заметить, что в литературе очень мало данных о структуре и свойствах функциональных амилоидных агрегатов. Однако следует упомянуть одну очень важную работу, в которой указаны отличительные признаки патологических и функциональных амилоидных агрегатов на уровне их структуры (Ulamec, Radford, 2020). Авторы данной работы сравнили структуры амилоидных фибрилл А β -пептида и Orb2, полученные другими авторами (Hervás et al., 2020) методом крио-ЭМ. Фибриллы А β -пептида, как известно, участвуют в развитии патологии в мозге при болезни Альцгеймера, т.е., являются патологическими амилоидными агрегатами. Фибриллы Orb2, которые также локализуются в мозге, напротив, являются функциональными амилоидами, участвующими в формировании долговременной памяти у *Drosophila melanogaster*. Несмотря на обнаруженное морфологическое сходство фибрилл А β -пептида и Orb2, на структурном уровне Ulamec и Radford (2020) выявили значимые различия. Обе структуры фибрилл А β -пептида и Orb2 содержали ~30 остатков в структурированном ядре фибриллы. Для А β (1-40) только первые ~4-10 аминокислотных остатков оставались неструктурированными, тогда как их большая часть участвовала в формировании амилоидного ядра, в то время как у Orb2В (самой длинной изоформы Orb2) количество аминокислотных остатков, остающихся неупорядоченными, составляло 650 (Ulamec, Radford, 2020). Т.е., только незначительная часть аминокислотных остатков этого белка участвовала в формировании амилоидного ядра.

Таким образом, на основании полученных данных авторы (Ulamec, Radford, 2020) выявили структурные различия между функциональными и патологическими амилоидами. Сравнивая результаты выше процитированных авторов с результатами, полученными нами, обращает на себя внимание тот факт, что как у функциональных амилоидных агрегатов Orb2, так и у амилоидных агрегатов титина и С-белка лишь незначительная часть аминокислотных остатков полипептидной цепи участвует в образовании амилоидной структуры. Таким образом, учитывая выявленные нами структурные особенности амилоидных агрегатов титина и С-белка, можно говорить о функциональной, а не патологической амилоидной природе этих агрегатов.

Итак, подводя итог вышеописанным данным, можно заключить, что для гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка характерен особый путь агрегации, заключающийся в способности формировать только аморфные амилоидные агрегаты. При этом наблюдаются следующие особенности агрегации этих белков: (1) высокая скорость образования амилоидных агрегатов при отсутствии фазы нуклеации (зародышеобразования); (2) отсутствие изменений во вторичной структуре при агрегации; (3) обратимость процесса агрегации. На основании данных, полученных структурными методами анализа, можно сделать предположение, что формирование амилоидной кросс- β структуры, обнаруженной в агрегатах титина и С-белка, может происходить на этапе их олигомеризации, т.е., на самой начальной стадии процесса агрегации, когда в растворе неагрегированных нативных молекул этих белков уже присутствуют их олигомеры. Из таких олигомеров, внутри которых, по всей вероятности, имеются участки с кросс- β структурой, в дальнейшем формируются более крупные агрегаты, на что указывают данные КД, ИК-Фурье спектроскопии и СМУРР. Наиболее близкий по агрегационным свойствам амилоидогенный белок, описанный в литературе, является β -лактоглобулин. Однако в отличие от β -лактоглобулина, способного формировать как высокоупорядоченные фибриллы, так и аморфные агрегаты, агрегация гладкомышечного титина и С-белка проходит только по пути формирования аморфных агрегатов.

Необычная способность исследованных мультидоменных мышечных белков формировать олигомеры даже в условиях высокой ионной силы (более 0.6 М для титина), по-видимому, является следствием отобранных в процессе эволюции особенностей аминокислотного состава и структуры, которые, в свою очередь, необходимы для выполнения тех или иных функций в мышечных клетках. Поэтому амилоидную агрегацию этих белков можно отнести скорее к функциональной, чем к патологической.

ГЛАВА 7. ВОЗМОЖНАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ АГРЕГАТОВ ТИТИНА И С-БЕЛКА В ОРГАНИЗМЕ И МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА ОТ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АГРЕГАЦИИ ЭТИХ БЕЛКОВ

7.1. Связь механической жесткости со структурными особенностями амилоидных агрегатов

Полученные нами данные о структурных изменениях при агрегации гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка *in vitro* указывают на уникальный механизм формирования этими белками амилоидных агрегатов. Учитывая обратимость амилоидной агрегации мультидоменных мышечных белков и относительно высокую скорость самого процесса агрегации *in vitro*, можно рассмотреть возможность подобной агрегации *in vivo*, а также возможную функциональную роль этого процесса в мышечных клетках. Например, в клетках поперечно-полосатых мышц. Для начала необходимо выяснить, возможно ли разворачивание Ig- и FnIII-подобных доменов титина и С-белка *in vivo* с последующим образованием межмолекулярных связей, способствующих формированию временных амилоидных участков? Известно, что для разворачивания доменов титина *in vivo* (на изолированных миофибриллах поперечно-полосатых мышц) требуются незначительные силы (6-8 пН) (Rivas-Pardo et al., 2016; Eckels et al., 2019) и, следовательно, незначительные затраты энергии. Авторы сделали предположение о возможной функциональной роли такого раскрытия доменов титина в процессе развития актин-миозинового взаимодействия в саркомерах. В этой связи следует процитировать других авторов, обнаруживших в *in vitro* экспериментах, что взаимодействие частично открытых доменов титина может приводить к образованию амилоидоподобных структур (Borgia et al., 2015). Эти авторы на основании данных молекулярной динамики двух доменов титина описали возможность образования ряда нестабильных короткоживущих конформаций, получивших название «внутримолекулярные амилоиды». Мы в свою очередь описали возможный механизм образования водородных связей между частично раскрытыми доменами близко

расположенных молекул гладкомышечного титина внутри одного олигомера (Рис. 9 Б). Наши данные показывают возможность образования титином обратимых амилоидных структур без значительных изменений в структуре белка, в частности, без изменений вторичной структуры. Таким образом, внутримолекулярная структура амилоида, описанная (Borgia et al., 2015), нашла экспериментальные подтверждения в наших исследованиях и пригодна для описания процессов, происходящих в структуре титина и С-белка при образовании агрегатов.

Так возможна ли амилоидная или амилоидоподобная агрегация титина, С-белка или других белков в мышечных клетках? Можно предположить, что в саркомере между раскрытыми доменами белков формируется связь и структура по типу амилоидной, следовательно, жесткость на этом участке должна увеличиваться, что может иметь значение в изменении вязко-упругих свойств мышечных клеток.

Стоит также обсудить данные ДСК, свидетельствующие еще об одной особенности амилоидной агрегации титина. Из литературы известно, что амилоидные фибриллы или агрегаты некоторых белков плавятся и диссоциируют при температурах порядка 75-100°C (Azuaga et al., 2002; Rezaei et al., 2002; Baxa et al., 2004; Morel et al., 2006; Morel et al., 2010). Показано, что амилоидные фибриллы более устойчивы к температуре, чем нативный белок (их температуры перехода различаются примерно на 30-40 К) (Morel et al., 2010). Наши эксперименты показали, что температура плавления агрегированной формы ГМТ_{ВМИ} ненамного выше (всего на 4 К), чем у молекулярной формы титина. При этом энтальпии плавления агрегированной и неагрегированной форм ГМТ_{ВМИ} практически не различались. Эти данные свидетельствуют о том, что общая энергия связей при образовании агрегатов ГМТ_{ВМИ} практически не меняется. Таким образом, значительные изменения вязко-упругих свойств титина и мышцы в целом могут меняться при незначительных энергетических затратах. По-видимому, такая уникальная способность молекул титина быстро формировать амилоидоподобные более жесткие участки в I-зоне саркомера и быстро их разбирать является выработанной в процессе эволюции и, по всей вероятности, является важной для поддержания необходимого уровня мышечного сокращения и его регуляции. Нельзя исключить, что в А-зоне саркомера в процессе мышечного сокращения (приводящего к развитию механических деформаций А-диска) амилоидоподобные структуры формируются при взаимодействии развернутых участков молекул титина и С-белка для регулирования вязко-упругих свойств саркомера.

В контексте регулирования вязко-упругих свойств белков и их агрегатов необходимо коротко обсудить принципиальные различия между патологическими амилоидными агрегатами и функциональными амилоидами, к которым, по всей вероятности, относятся и амилоиды исследуемых нами мультидоменных мышечных белков. Избыточная жесткость является негативным признаком амилоидных агрегатов и присуща в основном патологическим амилоидным фибриллам. Известно, что амилоидные фибриллы из-за высокой жесткости способны механически разрывать клеточную мембрану, поэтому накопление амилоидных агрегатов, являющихся устойчивыми к протеолитической деградации, приводит к гибели клеток (Engel et al., 2008; Fitzpatrick et al., 2013) и развитию патологического процесса (Perys, 2001). Избыточная жесткость скорее всего обусловлена наличием преобладающей кросс β -структуры. Как уже было описано выше, из-за небольшого содержания кросс β -структуры у функциональных амилоидных агрегатов, а также у агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка, избыточной жесткости в их амилоидной структуре быть не может. Но временное увеличение жесткости на определенных участках белка в саркомере за счет формирования амилоидных участков может являться модулятором вязко-упругих свойств. Это может иметь важное функциональное значение, поскольку эластичность молекул титина создает основу для растяжения мышцы без негативных последствий, тогда как вязко-упругие свойства «пружинной» I-части его молекулы могут играть большую роль в регуляции процессов мышечного сокращения и внутриклеточной сигнализации (Kimura et al., 1984; Erickson, 1997; Kellermayer et al., 1997; Vikhliantsev et al., 2003; Вихлянцев и др., 2011). В А-зоне саркомера нельзя исключить формирование межмолекулярных амилоидных структур между молекулами титина и С-

белка. Известно, что С-белок тесно связан с титином в А-зоне саркомера, участвуя в поддержании высокоупорядоченной структуры саркомера (Tonino et al., 2019). Не исключено, что молекула С-белка так же, как и титина, может претерпевать механические деформации как при растяжении, так и сжатии мышечного саркомера. Следовательно, нельзя исключить возможное образование межмолекулярных амилоидных связей между этими белками, что может иметь значение для поддержания саркомерной структуры и развития необходимого уровня мышечного сокращения.

7.2. Агрегационные свойства титина *in vitro* и *in vivo*. Механизмы защиты клеток от агрегации титина

В продолжение обсуждения вопроса о возможности агрегации мультидоменных мышечных белков в клетках и возможной функциональной роли подобной агрегации *in vivo*, следует обсудить механизмы защиты клеток от белковой агрегации. В научной литературе обсуждается, что при растяжении саркомера поперечно-полосатых мышц домены титина могут разворачиваться, делая доступными скрытые гидрофобные участки, которые могут привести к агрегации белка и нарушению его функций (Minajeva et al., 2001; Rief et al., 1997). Следствием агрегирования развернутых Ig-доменов в I-зоне, по мнению выше процитированных авторов, может быть аномально высокая жесткость молекул титина и, следовательно, миоцитов. Для предотвращения агрегации Ig-доменов титина в этой части его молекулы с ним связываются малые шапероны (sHSPs). В частности, показано, что HSP27 и $\alpha\beta$ -кристаллин не взаимодействуют с дистальными Ig-доменами, расположенными вблизи А-диска саркомера, но связываются с Ig-доменами растяжимой части молекулы титина, расположенной между Z-диском и PEVK-последовательностью в I-зоне саркомера (Kötter et al., 2014). Следует заметить, что эти Ig-домены в отличие от PEVK- и N2B-последовательностей, более склонны к агрегации в условиях частичной денатурации (Kötter et al., 2014). Чем это объясняется? Известно, что белки, имеющие неупорядоченную структуру, устойчивы к агрегации благодаря различным механизмам: высокому суммарному заряду и низкой гидрофобности, низкому числу амилоидогенных участков и большому содержанию остатков пролина (Wright et al., 2005; Monsellier, Chiti, 2007). PEVK-участок титина богат пролином и имеет сравнительно высокий суммарный заряд (Tskhovrebova, Trinick, 1997). N2B-последовательность также содержит много остатков пролина и более высокий суммарный заряд, чем типичный Ig-домен титина (Kötter et al., 2014). Таким образом, наличие в составе молекулы титина PEVK- и N2B-последовательностей является защитным механизмом, снижающим вероятность агрегации этого белка *in vivo*. Однако в условиях перерастяжения мышцы, происходящем как при интенсивных физических нагрузках, так и при патологии (например, при ишемии, когда гибель отдельных миоцитов может привести к перерастяжению соседних клеток), вероятность разворачивания и, следовательно, агрегирования Ig-доменов титина сильно возрастает (Li et al., 2002). И хотя показано, что развернутые Ig-домены титина повторно сворачиваются *in vitro* даже при отсутствии шаперонов (Minajeva et al., 2001), в условиях *in vivo* при достаточно тесном расположении белков в саркомере этот процесс может быть затруднен, даже несмотря на защитные свойства шаперонов. В этом случае агрегация приведет к значительному увеличению жесткости нитей титина, что может иметь негативные последствия для сократительной активности миоцитов и мышцы в целом. Защитой от подобных изменений может быть повышенный протеолиз титина (и его жестких агрегатов) в саркомере. Однако этот путь не исключает накопления фрагментов титина в клетке и формирования ими агрегатов в цитозоле. В этом случае может произойти аутофагия клетки – последняя стадия защиты организма от неконтролируемой агрегации саркомерных цитоскелетных белков (Galvez et al., 2007; Willis et al., 2009; Kötter et al., 2014).

Обсуждая вопрос о типе амилоидной агрегации (функциональной или патологической), стоит отметить, что случаев трансформации функциональных амилоидов в патологические не зафиксировано. Скорее всего, существуют молекулярные механизмы защиты от такой

трансформации, выработанные в процессе эволюции. Так, известно, что в мультидоменных белках с гомологичными тандемными повторами соседние домены имеют низкую идентичность в аминокислотной последовательности. Эта особенность, сформировавшаяся, по-видимому, в результате эволюционного давления, предотвращает неправильную укладку белков и последующую агрегацию (Wright et al., 2005; Borgia et al., 2015). Принято считать, что низкая склонность к агрегации характерна для тех белков, у которых идентичность между доменами составляет менее 40%. Известны данные об идентичности отдельных доменов титина в аминокислотной последовательности (Wright et al., 2005; Borgia et al., 2015). Мы рассчитали идентичность аминокислотных последовательностей титина курицы и 3 паралогов С-белка кролика. Расчеты показали, что эти белки содержат только два домена с идентичностью более 50%. Средняя идентичность аминокислотной последовательности между парами соседних FnIII-подобных доменов или Ig-подобных доменов титина не превышает 40%, тогда как С-белка – 26%. Эти данные указывают на довольно низкую способность этих белков к агрегации, заложенную природой на уровне первичной структуры.

Результаты наших исследований указывают на то, что агрегаты титина и С-белка, формирующиеся *in vitro*, по своим свойствам классифицируются как функциональные. В связи с этим, возможную агрегацию этих белков в клетках *in vivo* мы рассматриваем не как патологическую, а – как полезную для функционирования мышечной клетки. Однако полностью исключить невозможность формирования в цитозоле клеток патологических агрегатов мультидоменных мышечных белков, проявляющих токсические свойства, нельзя, что подтверждают наши данные о негативном действии амилоидных агрегатов титина на адгезию клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами *in vitro* исследования показали, что гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок формируют амилоидные аморфные агрегаты. В формировании межмолекулярных амилоидных связей в аморфных агрегатах задействованы не целые молекулы, а только части (раскрытые участки) молекул этих белков. При формировании агрегатов титина и С-белка не происходит изменений в их вторичной структуре. Таким образом, амилоидная агрегация этих белков происходит при минимальных внутримолекулярных перестройках и сопровождается минимальными энергетическими затратами. Данные, полученные методами структурного анализа, показывают, что формирование амилоидной кросс-β структуры в агрегатах титина и С-белка может происходить на этапе их олигомеризации, т.е., на самой начальной стадии процесса агрегации, когда в растворе неагрегированных, нативных молекул этих белков уже присутствуют их олигомеры. Из таких олигомеров, внутри которых, по всей вероятности, имеются участки с кросс-β структурой, в дальнейшем формируются более крупные агрегаты.

Формирование амилоидных агрегатов исследованных мышечных белков происходит за относительно короткие временные интервалы (в течение 5-10 мин в случае С-белка и в течение 20-60 минут в случае титина). При этом наличие олигомеров на начальной стадии агрегации ускоряет этот процесс. Таким образом, агрегация исследуемых мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов происходит без образования ядер нуклеации, что отличается от процесса образования амилоидных агрегатов большинством других амилоидных белков.

Выявлена способность амилоидных агрегатов мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов дезагрегировать при повышении ионной силы. Эти данные, указывающие на обратимость процесса агрегации исследуемых белков, позволяют делать предположение о возможности функциональной амилоидной агрегации титина и С-белка в мышечных клетках *in vivo*.

Выявлено негативное действие амилоидных агрегатов титина на культуру гладкомышечных клеток и фибробластов. В частности, обнаружено нарушение адгезии клеток на поверхности, покрытой амилоидными агрегатами гладкомышечного титина. При

этом также было обнаружено, что нарушение адгезии клеток связано с топологическими особенностями поверхности, которую формируют амилоидные агрегаты белка и на которой находились клетки. Таким образом, впервые был представлен новый механизм влияния белковых амилоидных агрегатов на адгезию и выживаемость клеток.

Подводя итог, можно заключить, что для гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка характерен особый путь агрегации, заключающийся в способности формировать только аморфные амилоидные агрегаты. При этом наблюдаются следующие особенности агрегации этих белков: (1) высокая скорость образования амилоидных агрегатов при отсутствии фазы нуклеации (зародышеобразования); (2) отсутствие изменений во вторичной структуре при агрегации; (3) обратимость процесса агрегации. Полученные результаты расширяют представления о процессе амилоидной агрегации мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов и белков в целом.

ВЫВОДЫ

1. Гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок формируют аморфные агрегаты *in vitro*, что показано методами просвечивающей электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии.
2. Методами рентгеновской дифракции и спектрофлуориметрии с использованием красителя тиофлавина Т подтверждена амилоидная природа аморфных агрегатов исследуемых белков.
3. Формирование амилоидных агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка происходит за относительно короткие временные интервалы (5-10 мин для С-белка, 20 мин для гладкомышечной изоформы титина с м.м. 1500 кДа и 60 мин для гладкомышечной изоформы титина с м.м. 500 кДа) при значениях pH 7.0. Присутствие олигомеров исследуемых белков может объяснять их высокую скорость агрегации.
4. При формировании амилоидных агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка не происходит изменений во вторичной структуре белков. При этом методом ДСК обнаружены незначительные различия в термодинамической стабильности между неагрегированной и агрегированной формами гладкомышечного титина, что свидетельствует о низких энергетических затратах при формировании агрегатов данного белка.
5. Амилоидные агрегаты гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка не оказывали токсического действия на культуру гладкомышечных клеток аорты крысы и культуру фибробластов человека, однако амилоидные агрегаты гладкомышечного титина нарушали адгезию клеток.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых периодических изданиях:

1. **Бобылёв А.Г.**, Шпагина М.Д., Бобылёва Л.Г., Окунева А.Д., Пиотровский Л.Б., Подлубная З.А. Антиамилоидные свойства производных фуллерена C60. // Биофизика, 2012, Т. 57, вып. 3. С. 416-421. [**Bobylev A.G.**, Shpagina M.D., Bobyleva L.G., Okuneva A.D., Piotrovsky L.B., Podlubnaya Z.A. Antiamyloid properties of fullerene C60 derivatives. // Biophysics. 2012. V. 57. No. 3. P. 300–304. DOI: 10.1134/S0006350912030050] (K2).
2. Подлубная З.А., **Бобылёв А.Г.** О функциональных амилоидах мышечных белков семейства титина // Биофизика. 2012. Т. 57, вып. 5. С. 751-755. [Podlubnaya Z.A., **Bobylev A.G.** On functional amyloids of muscle proteins of titin family. // Biophysics. 2012. V. 57. No. 5. P. 577-580. DOI: 10.1134/S0006350912050168] (K2).
3. **Бобылёв А.Г.**, Бобылёва Л.Г., Вихлянцев И.М., Уланова А.Д., Салмов Н.Н., Подлубная З.А. Сравнительное изучение амилоидных свойств мышечных белков и АВ-пептидов мозга и подходов к разрушению их амилоидов *in vitro* // Биофизика. 2013. Т. 58, вып. 6. С. 961-

974. [Bobylev A.G., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Ulanova A.D., Salmov N.N., Podlubnaya Z.A. Comparative studies of amyloid properties of muscles proteins and brain AB-peptides and identification of approaches to destruction of their amyloids in vitro. // Biophysics. 2013. V. 58. No. 6. P. 754-765. DOI: 10.1134/S0006350913060055] (K2).
4. Bobylev AG, Galzitskaya OV, Fadeev RS, Bobyleva LG, Yurshenas DA, Molochkov NV, Dovidchenko NV, Selivanova OM, Penkov NV, Podlubnaya ZA, Vikhlyantsev IM. Smooth muscle titin forms in vitro amyloid aggregates. // Bioscience Reports. 2016. V. 36, iss. 3. Art.No. e00334. DOI: 10.1042/BSR20160066. (K1/Q2)
5. Yakupova E. I., Vikhlyantsev I. M., Lobanov M. Y., Galzitskaya O. V., Bobylev A.G. Amyloid properties of titin // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82, No. 13. P. 1675-1685. DOI: 10.1134/S0006297917130077. (K1/Q2)
6. Yakupova EI, Vikhlyantsev IM, Bobyleva LG, Penkov NV, Timchenko AA, Timchenko MA, Enin GA, Khutzian SS, Selivanova OM, Bobylev AG. Different amyloid aggregation of smooth muscles titin in vitro. // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2018. V. 36, iss. 9. P. 2237-2248. DOI: 10.1134/S0026893319010035 (K1/Q1).
7. Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: history and relationship. // Bioscience Reports. 2019. V. 39, iss. 1. pii: BSR20181415. DOI: 10.1042/BSR20181415. (K1/Q2)
8. Bobylev AG, Kraevaya OA, Bobyleva LG, Khakina EA, Fadeev RS, Zhilenkov AV, Mishchenko DV, Penkov NV, Teplov IY, Yakupova EI, Vikhlyantsev IM, Troshin PA. Anti-amyloid activities of three different types of water-soluble fullerene derivatives. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2019. V. 183. Art.No. 110426. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110426 (K1/Q1)
9. Бобылёв А.Г., Якупова Э.И., Бобылёва Л.Г., Галзитская О.В., Никулин А.Д., Шумейко С.А., Юршенас Д.А., Вихлянцев И.М. Изменения структуры титина при его агрегации. // Молекулярная биология. 2020. Т. 54. № 4. С. 643-652. DOI: 10.31857/S0026898420040047 [Bobylev AG, Yakupova EI, Bobyleva LG, Galzitskaya OV, Nikulin AD, Shumeyko SA, Yurshenas DA, Vikhlyantsev IM. Changes in Titin Structure during Its Aggregation. //Molecular Biology (Moscow). 2020. V. 54, iss. 4. P. 643-652. DOI: 10.1134/S0026893320040044] (K1/Q3).
10. Yakupova EI, Bobylev AG, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM. Study of the complement activation by amyloid aggregates of smooth muscle titin *in vitro*. // Journal of Immunoassay and Immunochemistry. 2020. V. 41, iss. 2. P. 132-143. DOI: 10.1080/15321819.2019.1694943. (K1/Q2)
11. Бобылёва Л.Г., Якупова Э.И., Уланова А.Д., Удадьцов С.Н., Шумейко С.А., Салмов Н.Н., Бобылёв А.Г., Вихлянцев И.М. К вопросу об особенностях агрегации мультидоменных мышечных белков. // Биофизика. 2019. Т. 64. № 5. С. 837-840. DOI: 10.1134/S0006302919050016. [Bobyleva L.G., Yakupova E.I., Ulanova A.D., Udaltsov S.N., Shumeyko S.A., Salmov N.N., Bobylev A.G., Vikhlyantsev I.M. On the Peculiarities of the Aggregation of Multidomain Muscle Proteins. // Biophysics. 2019. V. 64. P. 667–670. DOI: 10.1134/S0006350919050026] (K2).
12. Bobyleva, L.G.; Shumeyko, S.A.; Yakupova, E.I.; Surin, A.K.; Galzitskaya, O.V.; Kihara, H.; Timchenko, A.A.; Timchenko, M.A.; Penkov, N.V.; Nikulin, A.D.; Suvorina, M.Y.; Molochkov, N.V.; Lobanov, M.Y.; Fadeev, R.S.; Vikhlyantsev, I.M.; Bobylev, A.G. Myosin Binding Protein-C Forms Amyloid-Like Aggregates *In Vitro*. // International Journal of Molecular Sciences. 2021, 22, 731. DOI: 10.3390/ijms22020731 (K1/Q1)
13. Bobylev AG, Fadeev RS, Bobyleva LG, Kobyakova MI, Shlyapnikov YM, Popov DV, Vikhlyantsev IM. Amyloid Aggregates of Smooth-Muscle Titin Impair Cell Adhesion. // International Journal of Molecular Sciences. 2021. V. 22, iss. 9. Art.No. 4579. DOI: 10.3390/ijms22094579 (K1/Q1)
14. Yakupova EI, Bobyleva LG, Shumeyko SA, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Amyloids: The History of Toxicity and Functionality. // Biology (Basel). 2021. V. 10, iss. 5. Art.No. 394. DOI: 10.3390/biology10050394 (K1/Q1)
15. Бобылёва Л.Г., Габдулхаков А.Г., Салмов Н.Н., Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г. Исследование *in vitro* агрегационных свойств мышечного Х-белка. // Биофизика. 2022. Т. 67. № 4. С. 652-657. DOI: 10.31857/S0006302922040032. [Bobyleva L.G., Gabdulkhakov A.G., Salmov N.N., Vikhlyantsev I.M., Bobylev A.G. *In vitro* Study of the Aggregation Properties of Muscle X-Protein. // Biophysics. 2022. V. 67, iss. 4. P. 518–522. DOI: 10.1134/S0006350922040042] (K2)
16. Bobylev AG, Yakupova EI, Bobyleva LG, Molochkov NV, Timchenko AA, Timchenko MA, Kihara H, Nikulin AD, Gabdulkhakov AG, Melnik TN, Penkov NV, Lobanov MY, Kazakov

- AS, Kellermayer M, Mártonfalvi Z, Galzitskaya OV, Vikhlyantsev IM. Nonspecific Amyloid Aggregation of Chicken Smooth-Muscle Titin: *In Vitro* Investigations. // International Journal of Molecular Sciences. 2023. V. 24, iss. 2. Art.No. 1056. DOI: 10.3390/ijms24021056 (K1/Q1)
17. Бобылёва Л.Г., Тимченко М.А., Якупова Э.И., Вихлянцев И.М., **Бобылёв А.Г.** Особенности олигомеризации гладкомышечного титина и скелетного миозин-связывающего белка С. // Биофизика. 2023. Т. 68, вып. 3. С. 1-5. DOI: 10.31857/S0006302923030055. [Bobyleva L.G., Timchenko M.A., Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., **Bobylev A.G.** The peculiarities of oligomerization of smooth muscle titin and skeletal muscle myosin-binding protein C. // Biophysics. 2023. V. 68, iss. 3. P. 365-368. DOI: 10.1134/s0006350923030041] (K2).
 18. Бобылёва Л.Г., Урюпина Т.А., Тимченко М.А., Удальцов С.Н., Вихлянцев И.М., **Бобылёв А.Г.** К вопросу о пути амилоидной агрегации титина. // Биофизика. 2023. Т. 68, вып. 6. С. 1-8. DOI: 10.31857/S0006302923060212. [Bobyleva L.G., Uryupina T.A., Timchenko M.A., Udaltsov S.N., Vikhlyantsev I.M., **Bobylev A.G.** The pathway of amyloid aggregation of titin. // Biophysics. 2023. V. 68, iss. 6. P. 1085-1091. DOI: 10.1134/s0006350923060039] (K2).
 19. Бобылёва Л.Г., Урюпина Т.А., Пеньков Н.В., Тимченко М.А., Уланова А.Д., Габдулхаков А.Г., Вихлянцев И.М., **Бобылёв А.Г.** Структурные особенности агрегатов скелетномышечного титина. // Молекулярная биология. 2024. Т. 58. № 2. С. 314-324. DOI: 10.31857/S0026898424020143 [Bobyleva L. G., Uryupina T. A., Penkov N. V., Timchenko M. A., Ulanova A. D., Gabdulkhakov A. G., Vikhlyantsev I. M., **Bobylev A. G.** The Structural Features of Skeletal Muscle Titin Aggregates. // Molecular Biology (Moscow). 2024. V. 58, No. 2. P. 319–332. DOI: 10.1134/S0026893324020043. (K1/Q3).
 20. М.А. Тимченко, А.А. Тимченко, А.С. Казаков, И.М. Вихлянцев, Л.Г. Бобылёва, **А.Г. Бобылёв** Исследование методами СМУРР и ИК-Фурье спектроскопии структурных особенностей агрегатов гладкомышечного титина, сформированных в разных условиях *in vitro*. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2024. Т. 177, № 4. С. 459-465. DOI: 10.47056/0365-9615-2024-177-4-459-465. [M.A. Timchenko, A.A. Timchenko, A.S. Kazakov, I.M. Vikhlyantsev, L.G. Bobyleva, and **A.G. Bobylev** Investigation of structural peculiarities of smooth muscle titin aggregates, formed under different *in vitro* conditions, by SAXS and FTIR spectroscopy. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2024. V. 177, iss. 4. P. 454-459. DOI: 10.1007/s10517-024-06207-8]. (K2/Q3).

Статьи в сборниках научных конференций и тезисы докладов

1. Бобылёва Л.Г., Шумейко С.А., Якупова Э.И., Уланова А.Д., Салмов Н.Н., Вихлянцев И.М., **Бобылёв А.Г.** Миозин-связывающий белок С формирует амилоидоподобные агрегаты *in vitro*. // Материалы XII Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологическая подвижность» посвященного памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора З.А. Подлубной. Пущино, 17-19 мая 2019, с. 51-56.
2. **Бобылёв А.Г.**, Якупова Э.И., Шоно Я.А., Бобылёва Л.Г., Вихлянцев И.М. Возможная физиологическая роль обратимой амилоидной агрегации титина. // Материалы XII Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологическая подвижность», посвященного памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора З.А. Подлубной. Пущино, 17-19 мая 2019, с. 47-51.
3. **Bobylev A.**, Bobyleva L., Shumeyko S., Yakupova E., Vikhlyantsev I. Study of the amyloid aggregation of skeletal myosin binding protein-C. // EMBO Workshop. Protein quality control: From mechanisms to disease. 28 April – 3 May 2019, Costa de la Calma (Mallorca), Spain.
4. **Бобылёв А.Г.**, Бобылёва Л.Г., Шумейко С.А., Якупова Э.И., Тимченко М.А., Тимченко А.А., Пеньков Н.В., Молочков Н.В., Вихлянцев И.М. Особенности амилоидной агрегации миозин-связывающего белка С *in vitro* // Сборник научных трудов VI Съезда биофизиков России, 16-21 сентября 2019, г. Сочи, с. 51.
5. Шумейко С.А., **Бобылёв А.Г.**, Якупова Э.И., Вихлянцев И.М., Бобылёва Л.Г. Исследование структуры амилоидо-подобных агрегатов миозин-связывающего белка С // Гены и клетки, Том XV, № 3, Приложение, 2020, с. 74. VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, 12–15 октября 2020 г.

6. **Bobylev A.G.**, Pashkin M.O., Shymeyko S.A., Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Bobyleva L.G. Aggregation of skeletal myosin-binding protein C // Russian Conference with International Participation «Experimental and computational biomedicine» in memory of Professor Vladimir S. Markhasin, Ekaterinburg, May 26-28, 2021.
7. Урюпина Т.А., Бобылёва Л.Г., Тимченко М.А., Вихлянцев И.М., **Бобылёв А.Г.** Исследование морфологии комплексов титина и миозин-связывающего белка С методом атомно-силовой микроскопии // 26-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века», Пущино, 9–13 апреля 2023 г. с. 262-263.
8. Урюпина Т.А., **Бобылёв А.Г.**, Бобылёва Л.Г., Вихлянцев И.М. Изучение структуры агрегатов титина скелетных и гладких мышц *in vitro* // Сборник научных трудов VII Съезда биофизиков России, Краснодар, 17-23 апреля 2023 г., Т. 1, с. 233-234.
9. **Бобылёв А.Г.**, Урюпина Т.А., Бобылёва Л.Г., Пеньков Н.В., Тимченко М.А., Уланова А.Д., Габдулхаков А.Г., Вихлянцев И.М. Структурные изменения высокомолекулярной изоформы гладкомышечного титина при формировании амилоидных агрегатов // Теоретическая и экспериментальная биофизика: Материалы конференции «Теоретическая и экспериментальная биофизика», Пущино, 19–21 февраля 2024.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия
 БСА – бычий сывороточный альбумин
 ГМТ_{ВМИ} – высокомолекулярная изоформа гладкомышечного титина, м.м. 1500 кДа
 ГМТ_{НМИ} – низкомолекулярная изоформа гладкомышечного титина, м.м. 500 кДа
 DMEM – Модифицированная среда Игла Дульбекко
 ДРС – динамическое рассеяние света
 ДСН – додецилсульфат натрия
 ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия
 ДТТ – дитиотреитол
 ИК-Фурье – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье
 КК – Конго красный
 КД – круговой дихроизм
 кДа – килодальтон
 мМ – миллимоль
 МСК ПЗЧ – Мезинхимальные стволовые клетки пульпы зуба человека
 мМ – миллимоль
 мкм – микрометр
 м.м. – молекулярная масса
 мкм – микрометр
 нм – нанометр
 ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
 СМУРР – синхротронное малоугловое рентгеновское рассеяние
 С-белок – миозин-связывающий белок С
 ТТ – тиофлавин Т
 УФ – ультрафиолет
 Ф-актин – фибриллярный актин
 ФСБ – фосфатно-солевой буфер
 ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид
 ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
 ЭГТА – этиленгликоль бис- (β-аминоэтиловый эфир N,N',N'-тетрауксусной кислоты)
 FnIII – фибронектин-подобный домен
 Ig – иммуноглобулин-подобный домен
 pN – пиконьютон
 Rh – гидродинамический радиус
 RMS – среднеквадратичный параметр шероховатости (среднеквадратичное отклонение профиля шероховатости).